Déposé pour le Prix Laroze.
1913.

Prix Laroze 1913 (2)

Etude Analytique
des Lipoïdes et des matières grasses du sérum sanguin
appliquée
à la physiologie et à la pathologie
par

Martial Laudat
Pharmacien de 1° classe
Ex-Préparateur du Cours de Chimie Biologique
à l'Ecole Supérieure de Pharmacie
Ex-interne des Hopitaux.

§:§:§:§:§:§:§



Pendant nos années d'internat passées dans le service de M. le Professeur Widal, nous avons eu à peu près chaque jour l'occasion d'examiner le sang prélevé chez des malades atteints d'affections les plus diverses. Notre attention fut particulièrement attirée par l'opalescence ou même la lactescence que présentaient fréquemment certains sérums

Ces caractères avaient été signalés par les anciens auteurs chez les brightiques et les diabétiques. M.M. Widal et Sicard (1) en 1896 rappelèrent de nouveau l'attention sur eux et M. Jousset (2) en 1901, mettant hors de cause les matières albuminoïdes, les attribua définitivement à la lipémie c'est à dire à la présence en excès des graisses et des lipoïdes dans le sang.

Nos premières recherches dans la littérature chimique ou médicale, ne nous ayant pas fait rencontrer de méthode rigoureuse et complète pour l'étude détaillée de cette question, nous avons pensé qu'il y aurait une réelle utilité à combler cette lacune.

Ces considérations marquèrent le début de notre travail Depuis, l'attention s'est portée chaque jour davantage sur les lipoïdes; on a voulu s'en servir pour expliquer la plupart des phénomènes biologiques récemment découverts. Mais les méthodes usuelles d'analyse n'étaient pas adaptées à des recherches si délicates, et souvent le succès n'a pas répondu aux prévisions.

(1) F. Widal et A. Sicard. Opalescence et lactescence du sérum de certains albuminuriques. (Bull. et Mem. de la Soc. Med. des hop. de Paris. 6 nov. 1896 p. 766 et semaine médicale 1896 p. 456)

(2) A. Jousset. Des humeurs opalescentes de l'organisme (Thèse de Paris 1901)

Dans l'ordre médical, les importants travaux de M. Chauffard et de ses collaborateurs sur la cholestérine ont montré tout l'intérêt qu'il pouvait y avoir à suivre les variations des graisses et des lipoïdes du sang au cours des maladies.

Tous ces faits n'ont donc pu que nous encourager à persévérer dans nos recherches et si ce travail commencé à la fin de l'année 1909 ne parait qu'aujourd'hui, c'est que nous avons tenu d'abord à déterminer la valeur des techniques proposées jusqu'ici. Puis, comme aucune ne répondait à notre but, nous avons cherché, en nous basant sur les acquisitions de nos devanciers, à obtenir une méthode exacte et aussi simple que pouvait le permettre l'étendue d'un tel sujet.

Nous croyons avoir réalisé notre projet. Les expériences de contrôle auxquelles nous nous sommes d'abord livrés, puis les recherches éffectuées sur plusieurs centaines de malades, nous permettent d'espérer que les déductions que nous en avons tirées aux points de vue physiologique et pathologique reposent sur des bases sérieusement établies.

Dans un premier chapitre, nous résumons brièvement les travaux qui ont porté sur les graisses du sang, depuis leur découverte jusqu'à notre époque. Ce sera l'historique de la question et nous ne reviendrons pas sur les méthodes qui ont servi à ces recherches.

Nous examinerons ensuite ce qui a été proposé durant environ les dix dernières années à propos des graisses, de la

cholestérine libre ou éthérifiée, et des lipoïdes phosphorés.

A chaque corps correspond un chapitre particulier dans lequel les techniques sont résumées et discutées très rapidement .

Dans le sixième chapitre, après avoir relaté comment nous sommes peu à peu arrivés à établir notre méthode , nous exposons celle-ci en insistant sur les plus petits détails pour faciliter sa vérification et son emploi.

Nous résumons ensuite en quelques pages les résultats qu'elle nous a permis d'obtenir dans le domaine de la physiologie ou de la pathologie.

Enfin, nos conclusions font ressortir ce que nous croyons avoir acquis de nouveau au point de vue de l'analyse quantitative et de ses applications.

!/!/!/!,!/!/!/!/!/!/!

Chapitre I

Premiers essais sur la recherche et l'analyse des matières grasses du sang.

D'après Gobley, Hunter et Schwilgue (1) paraissent avoir signalé les premiers l'existence de matières grasses dans le sang. Elle devait être, présumaient-ils, analogue à celle de la substance nerveuse.

En 1813, Berzélius (2) constate la présence d'un corps gras, mais il le croit formé sous l'influence de l'alcool et de l'éther qu'il emploie pour l'obtenir. Chevreul (3) démontre qu'il préexiste dans le sang. En 1823 il l'extrait de la fibrine. Très voisine de la graisse du cerveau, elle peut cristalliser, contient du phosphore, s'émulsionne dans l'eau et peut donner des produits ammoniacaux.

En 1826 (4) Morin dose 0 gr.30 % de matière huileuse dans le sang épanché dans la poitrine d'un malade à la suite d'une rupture d'anévrisme.

En 1828 (5) Caventou étudiant un « sang blanc » ne s'occupe pas des graisses et cependant il démontre que l'albumine n'est pas la cause de cet aspect.

En 1831 (6) Le Canu, par épuisement du sang à l'aide

1. Hunter et Schwilgué. cités par Gobley - J.P.C. 1852. vol 21. p. 242.
2. Berzélius. Annales de Chimie t LXXXVIII p. 26. t. 18.
3. Chevreul - [illegible] - Ann. du museum d'Histoire Naturelle. 1823.
4. Morin J.P.C. 1826. page 248 t. 12
5. Caventou J.P.C 1828 page 627 t. 14
6. Le Canu J.P.C. 1831 t XVII p. 489 et 545

de l'alcool et reprise de l'extrait alcoolique par l'éther, isole une matière grasse cristallisable nacrée, fondant vers 150° et présentant de nombreuses analogies avec la cholestérine. Elle est identique à la matière grasse du cerveau décrite par Chevreul. D'autre part il obtient " un produit huileux, non phosphoré, qui sous l'action de la potasse, devient acide."

L'analyse de deux sangs lui donne les résultats suivants

	I	II
matière grasse cristallisable...	1 gr.20	2 gr 10
matière huileuse............	1 gr.00	1 gr 30

La même année Denis (1) extrait du sang deux graisses phosphorées: une blanche et une rouge: et quelquefois aussi de la cholestérine.

Le Canu (2), rapporteur du mémoire de Denis à la société de Pharmacie, montre que ces deux graisses phosphorées sont identiques et correspondent à celles de Chevreul et de Vauquelin; pour la cholestérine, il fait remarquer que l'auteur est trop empressé sur la façon dont il a opéré pour la séparer et l'identifier.

A la même époque, au cours de l'analyse du sang d'un ictèrique, Lecanu (3) obtient un volumineux extrait étheré: la matière grasse cristallisable y est très abondante.

En 1833 (4) Berzélius isole de la fibrine de boeuf, une matière grasse, soluble dans l'alcool, acide et non phosphorée, identique aux acides gras.

1 Denis J.P.C. 1831 t 17 page 522 - (Mémoires 2) " recherches expérimentales sur le sang humain, considéré à l'état sain, essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang humain - - JPC t 25 - 1839 p. 424)
2 Le Canu. JPC. 1831. t 17 page 522. et t 17 p. 549
3 " " " " XVII. p. 563. - ~~Chimie~~
4 Berzélius. Traité de Chimie t. VII

Boudet (1) après avoir traité le sérum déssèché par l'alcool bouillant, remarque que pendant le refroidissement il se dépose des flocons blancs nacrés. Il les isole et obtient un produit neutre, fondant à 36°, facilement soluble dans l'éther, difficilement soluble dans l'alcool froid, et donnant avec l'acide sulfurique une coloration rouge, comme la cholestérine. Il le regarde comme un corps nouveau et l'appelle " séroline ". D'autre part, sous la direction de Chevreul il identifie la cholestérine du sang avec celle du cerveau. Il obtient également la graisse phosphorée cristallisable et signale en plus la présence d'un savon alcalin , formé probablement par les acides oléïque et margarique. Enfin il conclut que la matière huileuse de Le Canu correspond au savon alcalin à la cholestérine et à la séroline.

En 1835, Le Canu (2) trouve 117gr.% de corps gras dans un sang laiteux, et en plus du savon alcalin et de la cholestérine, il en isole de l'oléine, de la margarine et de la stéarine qui ne se trouvent pas dans le sang normal.

En 1837, le même auteur (3) signale la présence dans le sérum d'acides oléïque et margarique libres mais constate l'absence de matière grasse phosphorée.

En 1839 Denis (4) donne comme éléments de la matière grasse du sang normal: la cholestérine, la séroline, la cérébrine ou graisse phosphorée, les acides oléïque, margarique et un acide volatil innomé: ces acides étant partiellement

1 Boudet . J.P.C. 1833. t. 19. p. 291 et p. 479 – Thèse: Essai critique et expérimental sur le Sang.
2 Le Canu J.P.C. 1835. t. 21 p. 284.
3 Le Canu J.P.C. 1837 t 23 p. 38 analyse par M Planche de la thèse de Le Canu . nov. 1837 (Etudes chimiques sur le sang humain)
4 Denis. J.P.C. 1839. t 4 p. 224

saturés par la soude.

Andral et Gavarret (1) dans leurs recherches sur les sangs pathologiques ne mentionnent pas les graisses.

En 1842. Personne et Deville (2) dans l'analyse du sang laiteux d'un goutteux, obtiennent 5 à 6 gr d'extrait éthéré pour 60 gr. de sérum. Il est constitué par de l'oléine et de la margarine.

En 1844 Figuier (3) dans son étude sur les globules rouges ne parle pas de matières grasses.

Becquerel et Rhodier (4) publient la même année leurs recherches sur la composition du sang normal et pathologique. Parmi leurs nombreuses et intéressantes analyses, retenons seulement, la composition des matières grasses du sérum normal:

matières grasses 1 g 60 %	séroline	0 g. 02
	matière grasse phosphorée	0 g 488
	cholestérine ---	0 g 08
	savons	1 g.004

Poggiale et Marchal (5) en 1848 trouvent respectivement dans le sang artériel ou veineux 1 g.10 ou 1 g.20 de matières grasses par litre de sérum.

En 1851, Gorup- Besanez (6) compare les principales méthodes usitées pour l'analyse du sang (Prévost à Dumas, Becquerel à Rhodier, Figuier, Schérer et Höpfle) mais il donne peu de renseignements sur les matières grasses.

1 Andral et Gavarret. J P C. 1840. t. 26 p. 382
2 Personne et Deville. J P C. 1842. t. 2. 213.
3 Figuier J P C. 1844 t. 6. 304
4 Becquerel et Rhodier. 1844. Recherches sur la composition du sang dans l'état de santé et dans l'état de maladie.
5 Poggiale et Marchal. J. P C. 1848. t 14. p 363. et Poggiale t 13. p. 190.
6. Gorup-Besanez. J P C. 1851. t 19. p. 69

Peu après, Verdeil et Marcet (1) proposent une technique modifiée pour l'analyse du sang.

En 1852, nous trouvons avec Gobley (2) un travail important qui, selon l'expression de l'auteur va coordonner et préciser les divers résultats de ses prédécesseurs. La substance grasse du sang se compose d'oléine, de margarine de cholestérine, de lécithine et de cérébrine. Pour l'obtenir, il épuise directement le sang par l'éther, le résidu est ensuite désséché et traité à plusieurs reprises par l'alcool bouillant. Il conclut de ses expériences qu'il n'existe pas dans le sang d'acides gras libres ou combinés: la séroline est un corps complexe, probablement un mélange d'oléine, de margarine et de cholestérine, la cholestérine est la seule substance cristallisable du sang, elle est identique à celle du jaune d'oeuf et à celle des calculs biliaires. La matière grasse phosphorée ou lécithine ne cristallise pas, elle fournit par décomposition des acides margarique, oléïque et glycérophosphorique. La cérébrine, substance azotée, se trouve également dans l'oeuf et se gonfle dans l'eau comme l'amidon. La putréfaction des graisses du sang fournit des acides oléique et margariques. Enfin la graisse du sang de boeuf est identique à celle du sang humain.

Toutes les conclusions de Gobley ne sont pas exactes, mais on peut dire qu'il a vraiment mis au point cette question des graisses du sang. Nous allons voir d'ailleurs que durant les années suivantes, on ne fera, après de nouvelles erreurs,

1 J.P.C. 1851 (Verdeil et Marcet) t 20. 89.
2. Gobley J.PC. 1852. t 21 p. 241.

qu'améliorer les procédés de dosage de l'auteur et ce n'est que bien lentement qu'on arrivera à préciser l'identité des divers composants de l'extrait éthéré.

Egalement en 1852, Lehmann (1) analyse le sang des veines porte et sushépatiques et trouve une plus grande quantité de substances grasses dans la première.

En 1854 parait le traité de Chimie pathologique de Becquerel et Rhodier (2) qui reproduit presque intégralement à propos des matières grasses du sang les termes de leur mémoire de 1844.

En 1857, Hoppe-Seyler (3) au sujet du dosage de la fibrine dans le sang donne une analyse de sérum de cheval où figure seulement le chiffre total des graisses (0,123 %)

N-B-

En 1866 (4) il s'occupe de l'existence de la cholestérine et du protagon dans les globules rouges. Liebreich (5) vient, en effet, de découvrir le protagon dans le cerveau l'année précédente, et conclut à la fin de son travail que ce corps doit être très répandu dans l'économie animale, et que là où l'on a parlé de graisse phosphorée il faut penser au protagon.

Hoppe Seyler isole donc ces deux corps des globules d'oies engraissées et du sang d'un leucémique, sa méthode d'extraction se rapproche de celle de Gobley puisqu'il épuise les globules par l'éther mais au lieu de séparer ensuite la cholestérine des graisses phosphorées (lécithine ou protagon) à l'aide de l'huile d'amandes douces comme Gobley, il emploie

1 Lehmann. J. Pc. 1852. t 21. 396
2 Becquerel et Rhodier - Traité de Chimie pathologique 1854.
3 Hoppe-Seyler { - Virchow - Archiv. XII 1857. p 483 - 486.
4 " { - Med. Chem. Untersuchungen - {1866 - 1871 - 169. 208 - 133-150 - 391. 398 - 394-399 - 551. 556
5. Liebreich. { - Deutsch. Naturf. Bericht XXXIX. 1864. p. 88
Annal. Chem. Pharm. CXXXIV - 1865 p. 29-44.
Fresenius. Zeitschrift - IV. 1865 p. 173-176 -

N-B En 1862. Flint cherche à résoudre la question de l'origine et de la nature de la cholestérine. American Journal of the medical sciences. oct. 1862.

la saponification par la potasse alcoolique. Il obtient ainsi la cholestérine relativement pure, et il évalue le protagon par un dosage de phosphore (minéralisation au salpêtre, passage par le molybdate et passé à l'état de pyrophosphate.)

Il conclut de ses analyses que les globules possèdent une quantité de cholestérine et de protagon assez constante et qu'ils ne renferment pas de graisses; dans le sérum au contraire, la cholestérine et le protagon varient beaucoup et il y a parfois de très fortes quantités de graisses. Il remarque que les variations de la cholestérine du sérum sont parallèles à celles des graisses. Il note enfin que ses dosages de protagon peuvent n'être pas très exacts.

L'année suivante, Hoppe Seyler (1) poursuivant ses recherches sur le sang ne parle plus de protagon mais d'une substance phosphorée organique soluble dans l'éther. Elle n'est pas enlevée complètement par les épuisements du sang à l'éther comme la cholestérine et il en reste une partie retenue par les matières protéiques. C'est pourquoi l'auteur va modifier sa méthode d'extraction et la troisième édition de son traité de chimie renferme la technique à laquelle il s'est arrêtée. Abandonnant définitivement le protagon, il ne mentionne plus dans ses analyses que des dosages de lécithine .
(Jüdell (2): analyse des globules humains; Hoppe Seyler (3) : composition des globules du hérisson, de la couleuvre.)

1. Hoppe-Seyler. med Chem. Untersuchungen. 1866-1871 (v. + haut) 293-297
2. Jüdell. - med Chem Untersuchungen 1866-1871 - I p. 386-390
3. Hoppe-Seyler. med. chem Untersuchungen. 1866-1871 p. 391. 393. 394-395

En 1869 il (1) publie les résultats d'examen de sang dans la chylurie. Comme dans ses recherches précédentes, il constate l'absence de graisse dans les globules alors que le sérum en renferme une notable proportion.

La quatrième édition de son traité traduite en français par Schlagdenhaufen (2) mentionne à propos de l'analyse des liquides séreux une modification pour le dosage des graisses Le liquide est d'abord traité par l'alcool, puis ensuite par l'éther: les extraits réunis et sèchés sont repris une dernière fois par l'éther. La suite des opérations n'a pas été modifiée. Notons en passant une curieuse note du traducteur, dans laquelle il explique qu'il n'a pas reproduit les tableaux d'analyse de l'auteur, car malgré la valeur de la méthode son emploi est très délicat et sujet à de nombreuses erreurs quelle que soit l'habileté de l'opérateur.

Commaille (3) en 1875 indique la saponification comme un moyen rapide et sûr pour la séparation de la cholestérine des graisses.

Bunge (4) donne en 1876 une méthode pour l'analyse quantitative du sang, mais les graisses ne sont pas mentionnées

Durant les années suivantes, la méthode d'Hoppe-Seyler va être presque toujours employée dans les recherches sur le sang, et quand nous la retrouverons en 1909, dans la dernière édition de son traité (5) nous verrons qu'elle n'a pas subi de modifications essentielles.

1 Hoppe Seyler Med. ch. Untersuch. 1866-1871 p. 551-556.
2. Hoppe Seyler. Traité d'analyse chimique appliquée à la physiologie et à la pathologie - 4° édit traduction de F. Schlagdenhaufen - 1877.
3 Commaille C. R. Ac. des Sc Paris t. 81. 1875 p. 819.
4 Bunge - Zeitschrift. Biol. XII. 1876 p. 191-216
5. Hoppe Seyler - Handbuch der physiologisch und pathologisch. chemischen Analyse - bearbeitet von Thierfelder. 8° edit - 1909.

En 1877 Drosdoff (1) étudiant la teneur en graisses du sang de la veine porte et des veines hépatiques conclut à la formation de cholestérine et de lécithine dans le foie.

Puis Freund et Obermayer (2) apportent les résultats de l'analyse du sang d'un leucémique.

Enfin Abderhalden (3) a établi ses tableaux de composition du sang des diverses espèces animales toujours d'après la méthode d'Hoppe-Seyler en y ajoutant les acides gras libérés de leurs combinaisons alcalines.

Cette question des savons avait déjà suscité bien des controverses. Dès 1874 Röhrig (4) niait leur existence; Zawilski (5) et Lebedeff (6) confirmèrent dans la suite cette opinion. En 1884, Hoppe Seyler (7) reprit la question et démontra que les savons existaient réellement dans le sang: il proposa même une technique pour les extraire et exposa les résultats qu'il avait obtenus sur le sang d'homme et d'animaux

Dans le travail mentionné ci-dessus, Lebedeff (6) avait critiqué la méthode proposée par Hoppe-Seyler ( ) dans la 5 éditions de son traité pour la séparation des acides gras des acides neutres. Hoppe-Seyler (8) répondit à Lebedeff que son traitement par le carbonate de soude fait avec précaution (au-dessous de 50°) ne pouvait attaquer les graisses neutres Cependant cette opération ne figure plus dans la dernière édition du traité.

1. Drosdoff Zeitschrift f. physiol Chemie. 1. 233-243.
2. Freund et Obermayer. Zeitschrift f. physiol Chem. 15. 310-318.
3. Em. Abderhalden – Zeitschrift f. phy. chemie t 23 - 521 - 531. - t 25 - 65 - 115 -
4. Röhrig. C. Ludwig. - Arbeiten aus der physiologischen anstalt zu Leipzig. 9 - 1874. p. 1
5. Zawilski. C Ludwig. " " " " " 11. 1876 p. 147
6. Lebedeff Arch. f. Anatomie und physiologie; Physiologische Abtheilung. 1883 p. 488
7. Hoppe-Seyler. Zeitschr. f. physiol Chem. 8. 1884 p. 503-507

Enfin Hürtle (1) en 1896 annonça la découverte dans le sérum de cholestérine à l'état d'éther oléïque et palmitique. Cet éther correspond à la séroline de Boudet dont Gobley avait déjà indiqué d'une façon satisfaisante la composition en la regardant comme un mélange de cholestérine d'oleine et de margarine.

Puis Letsche (2) en 1907 montra que la cholestérine existait aussi à l'état libre dans le sérum.

Nous sommes ainsi arrivés peu à peu jusqu'à l'époque actuelle, bien que notre intention au début de ce chapitre, fût d'étudier seulement ce qui ne gardait qu'un intérêt historique. Cependant nous avons voulu en même temps comprendre tout ce qui se rapportait à la découverte des constituants de l'extrait éthéré.

Nous considérons notre but atteint car nous laissons volontairement de côté l'étude de corps, tels que le protagon la jécorine ou la myéline dont l'existence dans le sang, ne parait pas suffisamment établie.

Nous regarderons donc comme éléments de la matière grasse du sérum sanguin susceptibles d'être isolés et dosés: les graisses neutres, les acides gras libres ou à l'état de savons, les lipoïdes phosphorés solubles dans l'éther, la cholestérine libre ou éthérifiée.

1. Hurtle Zeits. f. phy. Chemie. 21 p. 331. 88.
2. Letsch. " " " " 53. p. 31-112.

Dans les chapitres suivants, après avoir brièvement rappelé ce que nous savons sur la nature de ces corps et sur leurs propriétés nous exposerons et discuterons les méthodes qui ont été proposées et sont usuellement employées pour leur extraction et leur séparation quantitátive.

Chapitre II

Nature et Propriétés des Graisses et des Lipoïdes.

Les graisses qui existent dans le sang y sont à l'état de graisses neutres, d'acides gras libres et de savons.

Les acides palmitique, stéarique, et oléïque forment la base de ces combinaisons. A côté d'eux et en moins grande quantité se trouvent les acides volatils.

Si la nature et les proportions des composants de ces mélanges varient un peu avec les diverses parties de l'économie où on les rencontre les propriétés chimiques restent cependant les mêmes et sont celles des éthers de la glycérine en général: solubilité dans les solvants organiques, dédoublement par les alcalis avec formation de savons, dédoublement par les ferments (lipase) etc. Les acides gras et les savons que l'on peut trouver dans le sang sont les témoins de ces réactions.

Nous n'insisterons pas sur la détermination, la séparation et le dosage des adides gras supérieurs ou inférieurs, car dans notre travail, nous n'avons pas été amenés à ces précisions analytiques, en raison des très faibles quantités de produits que pouvait nous fournir notre prise d'essai habituelle.

On trouve ensuite des glycérides dans la molécule desquels il rentre un groupement phosphoré: ce sont les phos-

phatides. Ils sont caractérisés par leur solubilité dans les solvants organiques, par leurs combinaisons avec les chlorures de platine et de cadmium, leur oxydation rapide en solution éthérée. Par ébullition avec de l'eau de baryte, ils se décomposent en acides gras libres, en une base (qui souvent est la choline) et en acide glycérophosphorique.

On les classe d'après Thudicum (1) selon la teneur en azote et en phosphore de leur molécule en mono-aminophosphatides monoamino-diphosphatides, diamino-phosphatides, triamino-phosphatides etc.

A côté des phosphatides il convient de placer le protagon qui sous l'action de l'eau de baryte donne les mêmes produits de dédoublement et en plus des cérébrosides. Ces derniers corps ne sont plus phosphorés et par hydrolyse ils fournissent du galactose.

Nous étudierons un seul représentant des phosphatides: le groupe des lécithines, car leur existence seule parait à peu près admise dans le sang.

Les lécithines sont des éthers de la glycérine, dans lesquels on trouve deux fonctions alcool éthérifiées par deux restes d'acides gras (palmitique, stéarique, oléique ou même linoléique (Cousin) (2); la troisième est fixée à une molécule d'acide phosphorique, qui elle-même, est combinée à la façon d'un éther, à une molécule d'une base quaternaire la choline en général.

1 Thudicum. Chemische Constitution des Gehirns des Menschen. Tübingen 1901
2 Cousin. J. P. C. 18. 102. 1903 – 23. 225. 1906

La lécithine que nous rencontrons le plus fréquemment dans l'organisme est la distéaryllécithine.

$$
\begin{array}{l}
CH^2 - O - C^{18}H^{35}O \\
| \\
CH - O - C^{18}H^{35}O \\
| \\
CH^2 - O \diagdown \\
\quad\quad HO - P = O \\
C^2H^4 - O \diagup \\
\diagup \\
N \equiv (CH^3)^3 \\
\diagdown OH
\end{array}
$$

C'est elle que nous aurons toujours en vue, lorsque, dosant le phosphore des lipoïdes phosphorés, nous l'exprimerons en lécithine.

On extrait généralement les lécithines du jaune d'oeuf. Ce sont des substances jaunâtres hygroscopiques, très difficilement cristallisables, insolubles dans l'eau avec laquelle elles donnent des émulsions crémeuses colloïdales.

Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, l'éther de pétrole, peu solubles dans l'acétone et l'acétate de méthyle. La chaleur les décompose et elles fixent de l'iode par addition.

En solution éthéro-alcoolique elles sont précipitées par une solution alcoolique de chlorure de cadmium. La combinaison est un peu soluble dans l'alcool et dans l'éther (1) En solution alcoolique elles donnent avec le chlorure de platine un précipité jaune floconneux peu stable, analysé par Srecker (2).

D'après Thudicum ces réactions sont communes aux autres phosphatides (3).

1. Bergell. Berichte. XXXII. 2884.
2. Strecker. Zeit f. Chem. 1868. 437.
3. Thudicum. Chemische Constitution des Gehirns des Menschen. Tubingen 1901.

Les lécithinés à acide oléïque donnent la réaction de Pellenttofer. Leur solution est dextrogyre, mais devient inactive par chauffage à 100° (1). Elles présentent le phénomène de la biréfringence ce qui les différencie des graisses. (1)

Dans l'hydrolyse par l'eau de baryte ou les alcalis, on obtient de la choline, de l'acide glycérophosphorique et des acides gras à l'état de sel de baryte.

L'ébullition avec les acides minéraux étendus dédouble la lécithine et saponifie même l'acide glycérophosphorique. Par action du suc pancréatique, on obtient des acides gras, de l'acide glycérophosphorique et de la choline.

Enfin au point de vue biologique, la lécithine possède la propriété d'activer les toxines (2) et les venins (3) Le venin de Cobra, par exemple n'exerce par lui-même aucune action hémolytique; si on lui ajoute du sérum sanguin ou une petite quantité d'émulsion aqueuse de lécithine, on voit aussitôt se produire une hémolyse intense (4).

Il nous reste à étudier les lipoïdes non phosphorés . Parmi eux nous ne retiendrons que la cholestérine dont la présence dans le sang est seule bien établie.

La cholestérine est un terpène secondaire et dont la formule stéréochimique n'est pas encore connue d'une façon certaine. Sa formule brute est $C_{27}H_{46}O$ et les recherches de

1. Dastre et Morat . in Thèse de Dastre . Sc nat . Paris 1876.

2. Flexner et Noguchi.

3. Flexner et Noguchi. Calmette . Kyes . Morgenroth et Carpi.

4. Ransom. Noguchi. Wohlgemuth.

Windaus sur sa constitution l'ont conduit à la représenter ainsi:

$$
\begin{array}{ccccc}
 & (CH^3)^2\,C^{20}H^{51} - CH & & & \\
 & & & & \| \\
 & & & & CH^2 \\
 \diagup & & \diagdown & & \\
CH^2 & & CH^2 & & \\
 \diagdown & & \diagup & & \\
 & CH(OH). & & &
\end{array}
$$

On l'extrait des calculs biliaires et du cerveau. Elle cristallise par refroidissement de ses solutions alcooliques en tables rhombiques renfermant 1 molécule d'eau. Par évaporation de ses solutions ètherées ou chloroformiques, on obtient des aiguilles soyeuses très blanches qui ne contiennent pas d'eau de cristallisation.

Elle est complètement insoluble dans l'eau, dans les acides étendus et les alcalis même concentrés. Presque insoluble dans l'alcool froid, elle se dissout très abondamment dans l'alcool bouillant, l'éther, le chloroforme, la benzine, l'éther acétique. Les solutions de sels biliaires ou de savon en dissolvent une petite quantité. Elle fond entre + 145° et 147°: son pouvoir rotatoire en solution éthérée est lévogyre:

= – 31° 59 (1)

Elle possède de nombreuses réactions qui permettent de l'identifier même en solutions très diluées.

Réaction de Windaus (2): la cholestérine en solution étherée donne avec une solution de brome dans l'acide acétique (5 gr de brome pour loo g. d'acide acétique) de longs cristaux de cholestérine débromée. : 124°-125°

Réaction de Salkowski (3) si on additionne une solution chloroformique de cholestérine d'acide sulfurique concentré, le chloroforme se colore en rouge, puis en bleu, vert et jaune

1. Lindenmayer. J. f. pr. Ch. 90. 323. (1863)
2. Windaus - Ch. Z. 30. 1011. (1906)
3. Salkowski. Pflf. Ar. 6. 207. (1872)

L'acide sulfurique montre une fluorescence verte, et l'addition d'acide acétique donne une teinte rose, puis pourpre.

Réaction de Liebermann-Bürchard (1) à une solution chloroformique de cholestérine on ajoute un peu d'anhydre acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On obtient une coloration rose, bleue, puis verte. Pour de petites quantités de produit, c'est la teinte verte qui apparait aussitôt.

Réaction de Tschugajeff (2) La cholestérine dissoute dans l'acide acétique est additionnée de chlorure d'acétyle et de chlorure de zinc. On chauffe cinq minutes et il se produit une coloration rouge ou rose avec une fluorescence jaune verte analogue à celle de l'éosine.

Mentionnons encore les réactions de Schiff (3) (perchlorure de fer, acide chlorhydrique et chloroforme) de Denigès (4) (acide sulfurique, anhydride acétique et chloroforme) de Neuberg (5) (rhamnose et acide sulfurique) et d'Obermüller (6) (anhydride propionique et alcool).

Enfin Windaus (7) a proposé d'utiliser la formation d'un complexe de digitonine-cholestérine pour la recherche de la cholestérine et la séparation des graisses des lipoïdes phosphorés et même de ses propres éthers.

La cholestérine possède en effet la propriété de s'unir à des restes d'acides pour former des éthers. On a préparé des acétate, butyrate, stéarate, oléate, benzoate et chlorure

1. Bericht d. D. Chem. Gesell. 18. 1804 (1885) – Burchard. Diss. Rostock. 1889.
2. Ref. Z. f. ang. Chem. 1900 – S. 618
3
4. Denigès. Soc. Ph. Bordeaux. 1903.
5. Neuberg. Zeit. phy. Ch. XLVII. 335.
6. Obermüller. " " " XV. 39.
7. Windaus. Bericht d. d. Chem. Gesell. 42. 1909. p. 238.

de cholestérine. L'organisme animal et le sang en particulier, renferment de l'oléate et un peu de palmitate.

Ces éthers présentent à peu près les mêmes solubilités que la cholestérine, cependant leur solution dans l'alcool est plus difficile. Ils sont saponifiables, ne rancissent pas et possèdent des réactions colorées très voisines de celles de la cholestérine. La réaction de Liebermann en particulier leur est commune .

L'éther oléïque cristallise en longues et fines aiguilles F: 41°-45° et l'éther palmitique en plaquettes blanches F: 78°

La digitonine est absolument sans action sur eux (1) .

Pour séparer et doser la cholestérine totale, on utilise sa résistance à la saponification (2) ou bien la formation de produits d'addition avec le brome (3) et l'iode (4) ou enfin ses combinaisons avec l'acide benzoïque (5) et la digitonine (6)

Enfin au point de vue biologique la cholestérine présente des propriétés anti-hémolytiques (7) et antitoxiques (8) très intéressantes. Par contre ces éthers sont complètement inactifs. (9)

§:§:§:§:§

1 Windaus (loc. cit) .
2. Commaille (l. c.) Ritter. Zeit f phy. Ch. t 34. p. 430
3 Obermüller . Z. ff. phys. Ch. T. 16.
4 Lewkowitsch . B. t 25 . p 65 . 1899 .
5 Gerard . Contribution à l'étude des cholestérines végétales et animales. Toulouse 1895 .
6 Windaus (l. cit) .
7 Ransom , Bang et Forssmann - Dahlqvist . Iscovesco et Foucault . | Ransom - Deut. med Wochensch 1901. 196 | Iscovesco et Foucault Soc. Biol. 1908
8 Iscovesco . Hyer Sachs .. Physalis (Soc. Biol. 1897) . Kempner et Schepilewsky . (Zeit f. Hygiene) 1898 p. 43. Wassermann et Takaki
9 Windaus . (l. cit) .

Chapitre III

Méthodes d'Extraction

Les procédés qui ont servi jusqu'ici au dosage des matières grasses du sang, ne paraissent pas avoir été soumis par leurs auteurs à un contrôle assez sévère. Il suffit pour s'en convaincre de jeter les yeux sur les analyses publiées pour une même substance; autant d'auteurs, autant de résultats différents.

L'extraction des lipoïdes et des graisses constitue la première opération dans tous les dosages. C'est la plus importante car ses résultats servent de base à la détermination particulière de chaque corps. Aussi, durant les dix dernières années tous les auteurs se sont spécialement attachés à la perfectionner. Mais la plupart, ne pensant qu'à obtenir le rendement le plus élevé en extrait éthéré, ne remarquèrent pas qu'ils n'arrivaient à ce résultat qu'aux dépens de la pureté des produits.

Nous classerons les méthodes d'extractions en deux groupes:

1° Méthodes dans lesquelles un traitement approprié doit précéder l'extraction.

2° Méthodes dans lesquelles l'extraction a lieu directement.

1° Méthodes dans lesquelles un traitement approprié doit précéder l'extraction.

Si l'on veut extraire les matières grasses sans modifications, en employant leurs dissolvants habituels, ether, chloroforme, ether de pétrole, benzine etc, comme ceux-ci ne sont pas miscibles avec les liquides de l'organisme ou les bouillies d'organes, il sera nécessaire de chasser d'abord toute trace d'humidité.

Action de la chaleur. C'est le procédé le plus rapide et le plus fréquemment employé. On évapore au bain-marie et on termine la dessication à l'étuve à 100° (1)

Pour rendre l'épuisement plus éfficace, on a conseillé le mélange de la substance avec du sable (2) du sulfate de soude (3) ou du plâtre (4) on évite ainsi la formation d'un coagulum trop compact et la dessication est un peu hâtée.

Action du vide et dessication à froid. Pour éviter l'action peut-être nuisible de la chaleur, on a proposé de lui substituer ou bien l'évaporation dans le vide au-dessus d'acide sulfurique (5) ou encore l'absorption de l'humidité par des corps hygroscopiques, depuis le papier à filtrer (6) jusqu'à certains sels neutres desséchés: sulfate de soude (7) phosphate de soude (8) etc.

1 – (Emploi général par nombreux auteurs)
2 Gigant – Soc biol mai 1910 (et nombreux auteurs) –
3 Lapworth · Journal de pathol et bact · 1910 · vol 15 · 964
4 Lapworth
5 (Employé par plusieurs auteurs)
6 Otto Voss – Diss. Giessen · 1909.
7 – –
8 Lemmer et Chevallier Bull · général de thérapeutique · 164 · 18 · 701 nov 1912.
Aladar Uffer Bioch Ch · 40 · 138-144 avril 1912.

Quelque soit le mode opératoire adopté, on obtient finalement un produit bien sec sur lequel on peut faire agir l'un des dissolvants énumérés plus haut.

Le simple contact même avec des liquides bouillants est insuffisant et on doit le renouveler fréquemment. C'est pour rendre cette opération vraiment pratique que l'on a imaginé les appareils de lixiviation à chaud (Zulkowski, Soxhlet, Louise) (1,2). Malgré leur réelle commodité, aucun d'eux ne remplit exactement son but. En effet, l'extraction n'a plus lieu avec un liquide bouillant, car les vapeurs se condensent dans le refrigérant en gouttelettes et celles-ci arrivent à peine tièdes sur la substance à épuiser.

Berntrop (3), Kümagawa et Suto (4) ont fait construire des appareils, dans lesquels la substance est placée dans une nacelle au sein de la vapeur du dissolvant; dans ce cas le liquide condensé reprend vite au contact du produit la température d'ébullition.

Certains auteurs ont pensé que malgré les nombreux perfectionnements apportés, la présence de l'albumine constituerait toujours un obstacle à l'extraction des graisses. Pour l'éliminer, Pfluger (5) et ses élèves (6) ont utilisé la digestion pepsique, qui ne touche pas aux corps gras et transforme les matières protéiques. Cette méthode est un peu longue, on a proposé de lui substituer une simple ébullition de la substance dans un acide dilué (7): il se forme des acidalbumines

1 Zulkowski. Dinglers Polytechnische Journal 1875. p 298
2 Soxhlet. " " " 1879. p 461
3 Berntrop. Zeitsch. f. angew. Chemie 1902. p. 122.
4 Kümagawa-Suto Bioch. Zeitschr. 8-1908. 212-347.
5 E. Pfluger. Arch. f. d. gesam. Physiol. 91. 277.
6 Dormeyer. Arch. f. d. ges. Physiol. 61-3. 41.
7. Nerking. Arch f. d. ges Physiol. 73. 172.
E. Baur et Herm. Barschall. Arch Kais. Gesundh Amt. 30 94-69.

solubles, et les graisses se rassemblent à la surface du liquide.

Enfin Liebermann (1) puis Kümagawa et Suto (2) ont employé la saponification par les solutions alcalinés concentrées.

2° Méthodes dans lesquelles l'extraction a lieu directement

Elles sont basées sur l'emploi de dissolvants miscibles avec l'eau tels que l'alcool (3) ou l'acétone (4).. Cés substances déterminent la précipitation des albumines; on isole le précipité par filtration et on l'épuise dans un appareil approprié avec une nouvelle quantité de liquide jusqu'à ce que par évaporation, celui-ci ne laisse plus de résidu. On réunit les solutions qui doivent renfermer toutes les matières grasses .

Notons cependant que l'acétone seule ne peut être suffisante, car elle dissout mal la lécithine; dans ce cas on devra terminér par un traitement à l'éther.

A ce groupe se rattache la méthode d'Adam. Elle a été établie pour le dosage du beurre dans le lait: cependant, modifiée ainsi que M. Grigaut (5) l'a indiqué, elle peut s'appliquer au dosage de la cholestérine dans le sang. La petite quantité d'alcali contenue dans la liqueur d'Adam suffit pour solubiliser les substances albuminoïdes, et les graisses peuvent dès lors passer facilement dans l'alcool-éther.

1 L. v. Liebermann et S. Szekely. Arch f. d. ges physiol. 72. 360.
2 Kumagawa & Suto. Bioch. Zeitsch 8. 1908 p. 212 - 347.
3 Hoppe-Seyler. Handbuch. 7e éd. p. 482. Bogdanow. arch f. d. ges. physiol. 68. 431.
4 Rosenfeld Central f. inn. med. 21. n° 33. 833. 1900. O. Frank Zeitsch f. biol. 35. 5. 49. — T. Sasaki Communic. à la faculté d. méd. d. Kaiserl. Japan. Univ zu Tokio 7. n° 1. 23.
5 Biologie médicale. n° 3. 1913 p. 99.

Les procédés d'extraction on le voit sont nombreux .
Pour simplifier notre critique nous allons nous demander à propos de chaque mode opératoire, s'il répond à ces trois critériums:

1° l'extraction est-elle complète?

2° les matières grasses n'ont-elles pas subi pendant le traitement des modifications de nature à rendre impossible les analyse qualitatives et quantitatives ultérieures?

3° l'extrait éthéré obtenu est-il rigoureusement pur?

Aucun des procédés énumérés plus haut ne peut satisfaire à ces exigences; nous en avons établi la preuve soit à l'aide des travaux de nos devanciers (1) soit par nos recherches personnelles. (2)

Les méthodes d'extraction indirecte qui utilisent la dessication à chaud ou à froid, avec ou sans l'aide de corps étrangers, donnent toutes un extrait éthéré incomplet. On peut s'en rendre compte de plusieurs façons.

On peut d'abord traiter de nouveau par le même dissolvant le résidu de la première extraction; on remarque aussi que souvent, même après plusieurs jours d'épuisement, on retrouve de petites quantités de graisses retenues dans le produit à étudier. Si cette recherche est négative, on applique aux résidus les méthodes d'hydrolyse par les acides ou les alcalis, et on retrouve ainsi encore la présence de matières grasses.

Comment peut-on expliquer cette résistance à l'action

1. Pfluger, Kumagawa-Suto. (loc cit)

2

des dissolvants? Lorsqu'il y a coagulation par la chaleur et dessication, les matières grasses sont emprisonnées dans l'albumine, et la pulvérisation la plus minutieuse est insuffisante pour les libérer complètement. Mais se fait se produit même en l'abscence de coagulation. On peut admettre dans ce cas que les lipoïdes sont retenus aux substances albuminoïdes par des combinaisons qu'il aurait d'abord fallu détruire s'agit-il de lécithalbumines (1) et de protéocholestérides (2) nous ne pouvons l'affirmer et nous enregistrons seulement ce que l'expérience nous fait constater.

On peut prévoir maintenant que les méthodes, dans lesquelles les matières albuminoïdes sont d'abord décomposées ou précipitées, vont nous donner des résultats beaucoup plus satisfaisants. La saponification par les alcalis ou le traitement à l'alcool à l'aide de l'extracteur à chaud, sont en effet les procédés de choix pour réaliser l'extraction la plus complète

Il nous reste à voir si le produit obtenu par ces procédés répond aux deux derniers critériums que nous avons posés En premier lieu l'action des alcalis transforme complètement les lipoïdes. La lécithine et les éthers de la cholestérine sont dédoublés et les acides gras libérés viennent s'ajouter à ceux des graisses neutres et aux acides gras préexistants sans que nous puissions déterminer la valeur de leur apport .

En effet, le glycérophosphate et le phosphate de soude formés passent dans la solution aqueuse et se mêlent aux

1 Hoppe Seyler (med. chem Unters. p 216) Hammarsten (Skand. arch f physiol 17 -) Liebermann : Pflügers archiv 50 - 54 -
2 A. Grigaut . Soc. Biol . 8 juin 1912.

phosphates contenus dans notre substance à étudier. D'autre part on ne peut évaluer séparément la cholestérine libérée et la cholestérine libre.

Les méthodes basées sur la saponification directe ne peuvent donc pas être employées pour une analyse quantitative complète.

Il ne nous reste plus à examiner que la méthode à alcool. Elle peut nous donner un extrait éthéré complet, elle ne modifie ni les lipoïdes, ni les graisses: mais la reprise par l'éther anhydre suffit-elle pour éliminer rigoureusement toutes les impuretés? Nous verrons plus loin en détails, que ni l'éther anhydre, ni aucun autre autre dissolvant, ne peuvent assurer une purification suffisante. Les méthodes qui, comme celles de Soxhlet (1) donnent des extraits relativement purs, sont celles qui possèdent le plus mauvais pouvoir d'extraction.

Nous concluerons donc qu'aucune des méthodes proposées jusqu'ici, ne permet d'évaluer, par la pesée directe de l'extrait éthéré plus ou moins purifié, la totalité des graisses et des lipoïdes à l'état pur. Il est donc nécessaire de faire suivre l'extraction de la séparation et du dosage de chacun des corps qui nous intéressent.

!/!/!/!/!/!/!

1 Soxhlet Dinglers polytechnische Journal. 1879 p. 461

Chapitre IV

Méthodes de dosage des Graisses neutres et des acides gras.

La méthode générale de dosage commune aux graisses neutres et aux acides gras, consiste à traiter à chaud le produit à analyser par un alcali, puis à décomposer les savons formés par addition d'un acide, enfin à enlever les acides gras libérés par un de leurs solvants, l'éther en particulier.

Mais nous venons de voir que l'extrait éthéré des liquides organiques ou des bouillies d'organes, renferme, à côté des graisses proprement dites, des lipoïdes capables de fournir par hydrolyse des acides gras qui, en s'ajoutant à ceux des graisses viennent fausser les résultats.

Nous avons donc à étudier ici, comment dans les méthodes précédemment décrites on a cherché à éviter cette cause d'erreur, puis comme les procédés employés ne nous ont pas donné satisfaction, nous exposons brièvement par quelles modifications, nous avons pu dans nos recherches doser d'une façon à peu près rigoureuse les graisses neutres et les acides gras

On pouvait penser:

1° à éliminer tous les lipoïdes susceptibles de fournir des acides gras.

2° à décomposer, par une saponification ménagée, seulement les lipoïdes, dont le dosage ultérieur permettrait de calculer les acides gras libérés.

3° à combiner enfin les deux méthodes, c'est à dire, à éliminer les lipoïdes dont on ne pouvait par la suite évaluer l'apport en acides gras; puis, à saponifier le reste y compris les lipoïdes dont nous pouvions connaitre la teneur en acides gras.

1° Elimination des Lipoïdes susceptibles de fournir des acides gras.

A/ de la lécithine (lipoïdes phosphorés).

Elle peut se faire de deux façons:

a/ en nature - elle est basée sur l'emploie d'un corps dans lequel la lécithine seule est insoluble: c'est l'acétone du commerce ou mieux encore l'acétone pure du bisulfite (1) -

Nos essais, confirmés par ceux de Kümagawa (2) nous ont montré que cette séparation n'avait pas de valeur. Nerking (3) a proposé une modification qui permet d'obtenir des résultats meilleurs, mais toutefois insuffisants.

B/ en combinaisons . On a pensé à utiliser la propriété de la lécithine de se combiner avec le chlorure de platine (4) ou le chlorure de cadmium (5).

Ces méthodes recommandables pour une extraction qualitative, n'offrent pas d'intérêt pour un dosage rigoureux.

1 (employée par plus. auteurs : pas d'auteur [illegible])
2 Kumagawa et Suto (loc. cit).
3 Nerking. Zeit. f. physiol. Chemie 56 - 89.94.
4 Bergell Berichte d. d. Chem. Gesell. XXII 2984 Ulpiani Atti. acad. dei Lincei (5) X. 368.
5. Strecker. Zeit. f. Chem. 1868. 437. et Liebig. annalen. 148. 77 (1868).

Nous ne possèdons donc pas actuellement de technique exacte pour isoler la lécithine.

B/ <u>de la Cholestérine</u>

a/ <u>en nature</u>. Ce procédé décrit consiste à traiter l'extrait éthéré par l'éther acétique pur à la température d'ébullition puis à laisser refroidir lentement. Tous les corps gras autres que la cholestérine et ses éthers sont intégralement précipités.

Cette méthode séduisante a été plusieurs fois essayée au cours de nos recherches. La cholestérine n'est pas précipitée mais par contre il reste des graisses en solution d'une façon notable; ce qui enlève toute valeur quantitative.

B/ <u>en combinaison</u> . Windaus (1) a signalé la propriété de la cholestérine, de former avec la digitonine un complexe insoluble dans l'alcool froid et dans l'éther. Il s'en est servi pour l'étude des reins normaux et pathologiques (2) et Fraser et Gardner (3) puis Mayer et Schaeffer (4) ont confirmé ses résultats.

2° Saponification ménagée de l'extrait éthéré.

Salkowski (5) puis Pribram (6) ont indiqué des techniques pour séparer les éthers de la cholestérine des graisses. Elles reposent sur la rapidité de la saponification ou l'emploi de la lipase comme agent de dédoublement.

Nous avons nous-mêmes essayé le faible pouvoir de saponification de l'eau de baryte. Nous espérions ainsi dédoubler les graisses neutres et peut-être une petite quantité de léci-

1 Windaus · Berichte der Deutsc. Chem Gesel. 42. 1909. 238
2 " Zeitschr. f. physiol. Chemie 69 - 1910 - page 110.
3 Fraser et Gardner Proceeding of Royal Society 1910 · 89 · 559-568.
4 Meyer et Schaeffer · Soc · Biol · 2 mai 1912
5 Salkowski · Berichte Zeitung · I · 413 - 1906.
6. Pribram · Bioch · Zeitschr · 1 · 1906.

thine mais ne pas toucher aux éthers de la cholestérine.

L'expérience nous a montré dans notre cas, comme dans ceux de Sakowski et Pribram, que les éthers de la cholestérine étaient assez facilement saponifiables pour ne pas permettre que les graisses soient décomposées totalement avant qu'eux-mêmes ne fussent touchés.

Nous pouvons probablement placer ici la méthode par alcoolyse de Fourneau et Piettre (1)

Dans leur communication, ces auteurs mentionnent qu'ils obtiennent un dépôt de cholestérine bien cristallisée et très pure. Ils indiquent même ce procédé comme une excellente méthode de dosage de la cholestérine. Il est fort probable que là encore les éthers de la cholestérine sont dédoublés comme les graisses et les lipoïdes phosphorés.

Ce détail n'est pas précisé et nous n'avons pu le vérifier jusqu'ici.

3° Combinaison des deux méthodes.

Windaus (2) ayant remarqué que les éthers de la cholestérine sont sans action sur la digitonine, proposa de séparer ainsi la cholestérine de ses éthers. Il analysa par cette méthode les extraits éthérés de reins humains et obtint de bons résultats. Fraser et Gardner (3) firent d'après le même principe des dosages sur le sang des lapins.

Tous les trois n'avaient comme but que la détermina-

1 Fourneau et Piettre Bull. Soc. Chimique 1912. et avant eux: Thierfelder et Werner. Z f phy. Chem. 1909 44 p 366.

2 Windaus (loc cit)

3 Fraser et Gardner (loc. cit)

tion des rapports entre les cholestérines libre et éthérifiée; aussi pour appliquer ce procédé à l'analyse complète de l'extrait éthéré, il était nécessaire de procéder à des vérifications, puis comme nous le verrons, d'apporter certaines modifications.

Nous pouvons dire que nous sommes arrivés à des résultats d'une grande exactitude; si l'on sépare d'abord la cholestérine libre de la digitonine, on peut saponifier ensuite le reste de l'extrait éthéré sans précautions particulières. En effet, les dosages du phosphore et de la cholestérine libérée nous font connaitre l'apport des acides gras, et nous pouvons alors évaluer d'une façon sensiblement exacte la quantité d'acides gras venant des graisses neutres et des acides gras libres.

§:§:§:§:§:§

( ) Nous disons " sensiblement ", car nous sommes obligés d'admettre pour les calculs que tout le phosphore est représenté par de la lécithine distéarique et que la cholestérine combinée l'est uniquement à l'acide oléique.

Chapitre

Méthodes de dosage de la Cholestérine

Nous devrions étudier seulement les méthodes susceptibles d'être employées dans notre analyse générale. Nous donnerons cependant plus de développement à cette question. On a beaucoup étudié depuis quelque temps les variations de la cholestérinémie; comme presque tous les dosages ont été faits par des méthodes colorimétriques, nous ne pouvons les passer sous silence.

Les découvertes de Hürtle (1) et de Lestche (2) ont obligé à distinguer deux séries de méthodes: les unes déterminent la cholestérine totale, les autres les cholestérines libres et éthérifiée.

1° Méthodes de dosage de la Cholestérine totale.

Les méthodes colorimétriques sont les plus simples . Dès 1889 Burchard (3) proposa l'emploi de la réaction de Liebermann pour doser la cholestérine. L'année suivante Schulze (4) en critiqua la valeur. En 1910, Grigaut (5) reprit le principe de Burchard et détermina les conditions exactes dans lesquelles on peut faire un dosage. L'année suivante en collaboration avec Chauffard et Laroche (6) il fit de nombreuses applications de sa méthode à la pathologie. Il fut

1 Hürtle Zeit f. physiol. Chemie. 21. 331 – 45-46.
2 Letsche – " " " 53 – 6. 31 – 112.
3 Burchard. Diss. Rostock. 1889.
4 Schulze. Zeit. f. physiol. Chemie. 14. 1890. 491. 583.
5 Grigaut. Soc. biol. 7-14 mai 1910 – 4 nov. 1911.
6 Chauffard Laroche et Grigaut. Soc. Biol. 1911. 7-14-21 janvier – 4 février. 4 mars. 1. 8 avril. 27 mai. 24 juillet

vivement pris à partie peu après par Gérard (1) et Iscovesco (2) Ce dernier proposa de substituer à la réaction du cholestol celle de Tschugaieff (3) qui, d'après lui, présentait plus de stabilité et de sensibilité. Des expériences de Mauriac et Defaye (4) montrèrent un peu plus tard que cette réaction ne présentait aucun avantage sur celle de Liebermann..

Neumann et Hermann (5) puis Weston et Kent (6) firent aussi des dosages colorimètriques, mais par des procédés moins prècis que celui de Grigaut.

A la suite des différentes critiques, qui lui ont été adressées, que peut-on penser du dosage colorimetrique de la cholestérine? Il est rapide et essentiellement pratique. On lui objectera certainement un peu d'imprécision par suite de la vitesse variable de la réaction et des causes d'erreurs possibles dans les appréciations. En tout cas, la technique de Burchard, heureusement précisée par Grigaut est certainement de toutes la plus recommandable.

Nous reconnaissons que pour une analyse exacte, les méthodes pondérales doivent être préfèrées; si le dosage demande ainsi plus de temps il offre par contre une plus grande certitude.

Boidin et Flandin (7) ont proposé une méthode très curieuse, basée sur les propriétés hémolytiques de la saponine et leur fixation par la cholestérine. Disons de suite avec

1 Gérard Soc. Biol. 3 fév 1912.
2 Iscovesco. " 17 fév 1912
3 Iscovesco. " 24 fév 1912
4 Mauriac et Defaye. Soc. Biol 13 juillet 1912.
5 Neumann et Herman Wien Kl. Wochens. 23 mars 1911 - 19 - 412-417.
6 Weston et Kent Journal med. research. 26. (11). 3 p. 593. 1912. - Weston 26-1. 47-54 1912.
7 Boidin et Flandin Soc. Biol. 11 nov 1911.

ses auteurs qu'elle ne peut fournir que des renseignements cliniques. Cependant nous nous proposons d'en continuer l'étude comparative en rapprochant ses résultats de ceux que fournit la pesée. Nos premières recherches (1) ont porté sur le sérum des ictériques chez lesquels la cholestérine libre domine, et nous ne déterminons dans nos dosages que la cholestérine totale. Nous allons reprendre cette comparaison avec des sujets normaux et avec des brightiques; chez eux, en effet, nous avons mis en évidence par notre méthode générale, l'existence de grandes quantités d'éthers de cholestérine. Nous pourrons donc vérifier si, comme nous le prévoyons, le procédé de Boidin et Flandin s'applique seulement à la cholestérine libre.

On a aussi proposé d'appliquer au dosage de la cholestérine la propriété qu'elle possède de fixer le brome et l'iode. Ce sont les méthodes d'Obermüller (2) et de Lewkowitsch (3) Leur intérêt général ne se retrouve pas dans la pratique, surtout lorsqu'il s'agit de doser de très petites quantités de produits. En outre elle ne conviendrait pas à notre analyse générale.

Les méthodes pondérales sont toutes basées sur la saponification et la séparation des substances insaponifiables par un dissolvant approprié. Elles ne diffèrent entre elles que par la proportion où la nature de l'agent de saponification, par la température à laquelle cette opération se produit, enfin par la réaction alcaline ou acide du mélange au moment

M. Laudat in Oulmont et Boutin. Sem médicale. 1912

1 F. Widal, André Weill et M. Laudat. La lipémie des Brightiques. Sem médical. 6 nov. 1912.

2 Obermuller. Zeitschr. f. physiol Chemie. T. 16. p. 143.

3. Lewkowitsch. Bericht der deutsch. Chem. gesellsch. t. 4 - p. 65. 1899.

de l'extraction. Les méthode principales sont dues à Ritter (1) Kümagawa et Suto (2) Grigaut (3) etc.

D'après Kümagawa (4) dans la saponification des organes on n'obtiendrait pas de la cholestérine pure, mais un mélange qu'il appelle " l'insaponifiable."

Contrairement à l'opinion de Shimidzu (5) nous avons souvent employé la méthode directe de Kumagawa et Suto pour l'analyse des sérums, et les résultats ont toujours été très concordants.

La méthode de Grigaut (6) qui diffère un peu de la précédente; elle fournit toujours de la cholestérine bien cristallisée.

Dans le but d'isolér la cholestérine intégralement et rapidement, Gérard (7) puis Gardner (8) ont proposé de l'en séparer à l'état de benzoate. Mayer et Schaeffer (9) ont préféré former un complexe avec la digitonine. Ces procédés sont également intéressants: nous donnerons cependant la préférence au second à cause de sa rapidité.

Nous avons vu enfin à propos du dosage des graisses, que Fourneau et Piettre (10) obtenaient par alcoolyse la cholestérine bien cristallisée et pure. Comme dans leur note, ces auteurs n'apportent pas d'expériences de contrôle, nous attendrons l'apparition d'un mémoire plus détaillé pour porter un jugement.

En résumé, nous ne pouvons utiliser directement aucune

1 Ritter Zeitf f. Physiol Chem. 34 p. 430.
2 Kumagawa Suto (loc cit)
3 Grigaut. Soc Biol 18 nov 1911. — 20 juillet 1912.
4 Kumagawa (loc cit)
5 Shimidzu. Bioch Zeitf 28. 3-4. p 237 - oct 1910.
6 Grigaut (loc cit)
7 Gérard Soc Biol. 8 fev 1919. et Thèse Toulouse 1895 (déjà citée)
8 Gardner. Proceed. Royal Soc. London 80 - 1908.
9 Mayer et Schaeffer Soc. Biol. 2 mars 1912.
10 Fourneau et Piettre Bull. Soc. Chim. 1912 p.

de ces méthodes puisqu'elles sont toutes destinées au dosage de la cholestérine totale.

2° Méthodes de dosage de la cholestérine libre et éthérifiée

Mürtle (1) puis Hepner (2) ont donné des techniques pour faire cristalliser et séparer ainsi la cholestérine éthérifiée: ce ne sont pas des méthodes quantitatives. Le procédé de Letsche (3) pour mettre en évidence la cholestérine libre dans le sérum de cheval, possède la même valeur.

Nous n'avons à l'heure actuelle qu'une seule méthode, capable de nous fournir des résultats certains; c'est celle de Windaus. Nous en avons indiqué la principe à propos du dosage des graisses proprement dites et nous exposerons plus loin en détails comment, nous l'avons adaptée à notre analyse générale.

§:§:§:§:§:§:§:§

1 Hürtle Zeitsch. f. physiol. Chemie 21-331.
2 Hepner Arch. f. d. ges. physiol. 1898 - 73 602.
3 Letsche Zeitsch. f. physiol. Chemie 53 p. 31-112.

Chapitre

—

Méthodes de dosage des Lipoïdes phosphorés.

—

Les méthodes les plus simples consistent à isoler la lécithine à l'état naturel, ou à l'engager dans des combinaisons déterminées. Nous avons déjà passé en revue ces procédés à propos du dosage des graisses proprement dites. Nous n'y reviendrons pas puisqu'ils ne peuvent pas servir à un dosage exact.

Comme on ne peut isoler la lécithine, il faut chercher à doser un des éléments qui caractérisent sa molécule. Dans le mélange de graisses et de lipoïdes extraits du sérum, l'azote et le phosphore lui sont propres.

Le dosage de l'azote est facile, mais il n'a peut-être jamais été employé dans ce cas. En effet la lécithine en renferme relativement très peu, et surtout il est presque impossible d'éliminer toute trace d'impuretés azotées.

Aussi c'est toujours par le dosage du phosphore que l'on évalue la quantité de lécithine contenue dans un mélange de matières grasses. La reprise des extraits alcooliques par l'éther anhydre permet d'éliminer complètement la petite

quantité de phosphates qui auraient pu passer dans l'alcool.

L'opération comprend deux temps: la minéralisation du produit organique, puis la formation d'une combinaison phosphorée susceptible d'être facilement isolée et pesée.

Minéralisation - On emploie beaucoup pour la minéralisation la fusion de la substance à analyser, avec un mélange de carbonate et d'azotate de soude (1). On a objecté (2) à cette méthode la possibilité de pertes de phosphore par réduction des phosphates au contact du charbon fermé et volatilisation En réalité, l'addition d'une quantité suffisante de mélange alcalin suffit pour éviter cette cause d'erreur. L'opération doit être conduite cependant avec précaution, car, pendant la carbonisation, si on chauffe trop vite les corps gras crépitent, la masse s'enflamme, et il peut en résulter des pertes par projections.

Bordas et Raczkowski (3) détruisent la matière organique par l'acide nitrique concentré et terminent l'oxydation par le permanganate de potasse.

Neumann (4) emploie l'ébullition avec un mélange d'acides azotique et sulfurique.

En résumé, tous ces procédés sont bons, et il n'y a qu'à choisir celui qui s'adapte le mieux aux conditions dans lesquelles on se trouve.

Dosage proprement dit. Une fois la minéralisation terminée il faut doser le phosphore. On peut opérer soit par pesée soit par volumétrie.

1 Moreau. Thèse Fac. Méd. Lyon 1901.
2 Jean Dormann Annal de Chim. Analytiq.
3 Bordas et Raczkowski C. R. Ac. Sc Paris CXXXIV. 1899.
4 A. Neumann. Arch f. physiol 1905 p. 208.

1° par pesée. La méthode classique consiste à précipiter le phosphore par la mixture magnésienne et à effectuer la pesée à l'état de pyrophosphate de magnésie.

En présence de peroxyde de fer et d'alumine il est préférable d'employer la précipitation par le molybdate d'ammoniaque; le phosphomolybdate formé est ensuite transformé en phosphate ammoniaco-magnésien, puis en pyrophosphate.

Pour déterminer facilement de très petites quantités de phosphore on a pensé à utiliser le poids moléculaire considérable de la combinaison avec le molybdate d'ammoniaque et on a étudié la possibilité de la pesée directe du phosphomolybdate obtenu..

On a proposé trois techniques:

a/ pesée du phosphomolybdate cristallisé avec molécule d'eau, après lavage à l'alcool et à l'éther.(1)

B/ Pesée du phosphomolybdate cristallisé sans eau, après dessication à l'étuve à 100° (2)

C/ pesée de l'anhydride phosphomolybdique provenant de la transformation du phosphomolybdate.(3)

Elles ont eu, toutes les trois, leurs critiques on a reproché notamment au produit déssèché à 100° de présenter une composition inconstante. Cette question a été reprise plusieurs fois, Villiers et Borg (4) en particulier montrèrent en 18 , qu'en se plaçant toujours dans des conditions déterminées on obtenait des résultats très satisfaisants.

On peut donc admettre désormais que cette méthode si sensible et si exacte convient spécialement pour le dosage des

1 N. von Lorenz. Zeitschr. f. angew. Chem. 46 193.
2 W. Pflücker - " " 48.715.
3 W. Fresenius et Grünhut - Zeitsch. f. analyt. Chem. 50-90-106.
4 Villiers et Borg. C.R. Ac. Sc. Paris t 116. 1893. p. 990.

plus minimes quantités de phosphore.

Frésénius (1) a signalé enfin le passage facile du phosphomolybdate d'ammoniaque au sel de baryum. Cette remarque peut être utilement employée dans les cas où le précipité parait devoir donner une pesée trop faible, car cette transformation double environ le poids du produit.

2° par volumétrie. Neumann (2) après avoir obtenu le précipité de phosphomolybdate dans des conditions très rapides, le lave et le dissout dans une quantité déterminée d'une solution de soude; après avoir porté le liquide à l'ébullition, il titre l'excès d'alcali et en déduit par le calcul le poids de phosphomolybdate et par suite celui du phosphore.

On a voulu enfin faire le titrage du phosphate formé à l'aide de l'azotate d'urane. Nous n'insisterons pas sur cette méthode qui ne convient pas pour des quantités de phosphore aussi petites que celles qui proviennent des lipoïdes du sang.

Nous avons adopté la méthode par pesée du phosphomolybdate d'ammoniaque, après dessication à 100°, en la modifiant qualque peu, pour le cas particulier de nos dosages.

§:§:§:§:§:

1 Frésénius. Analyse chimique quantitative (1) 8e édit française 1909 p. 479.

2 Neumann Arch f. physiol. 1907 p. 208 -

Chapitre VI

Technique générale adoptée

1° Exposé rapide des expériences personnelles qui ont précédé et déterminé la recherche d'une méthode générale.

Nos premières recherches datent de la fin de l'année 1909. A cette époque et durant une partie de l'année suivante, notre but a été d'extraire la totalité des graisses et des lipoïdes. Nous nous sommes occupés plus tard seulement de leur séparation.

Nous avons d'abord employé la méthode de Soxhlet (1) malgré les critiques dont elle avait été l'objet. Pour pouvoir épuiser le sérum par l'éther dans l'extracteur, il était nécessaire de la deshydrater complètement. Nous avons d'abord employé l'action de la chaleur; après avoir mêlé du sable au sérum, nous l'avons évaporé au bain-marie puis nous avons terminé la dessication à l'étuve. Au bout de peu de temps, nous lui avons substitué l'évaporation et la dessication dans le vide sulfurique. L'extraction fut toujours faite pendant une durée de six heures, avec de l'éther ordinaire ou distillé sur le sodium.

1 - E. Pfluger. Arch. f. d. ges. Physiol. 51. 277

Pour apprécier la valeur du traitement, nous avons continué à épuiser notre poudre pendant une seconde période de six heures: l'évaporation de l'éther nous a fourni une nouvelle quantité de matières grasses. L'opération répétée durant quatre jours, nous a constamment donné un résultat positif, très faible, il est vrai, en dernier lieu.

Nous avons alors épuisé le résidu par l'alcool dans l'appareil de Soxhlet. Après distillation de l'éther anhydre, nous avons obtenu une quantité de graisses plus abondante que dans le premier épuisement à l'éther.

Nous avons conclu de cette série d'expérience:
1° l'extraction éthéré du produit déssèché soit à chaud, soit dans le vide, était absolument insuffisante, même après plusieurs jours de traitement.
2°/ l'alcool paraissait avoir un très bon pouvoir dissolvant vis-à-vis des graisses et des lipoïdes.

Comme l'alcool présente les grands avantages d'être miscible avec le sérum, de précipiter les substances albuminoïdes à un état d'extrême division, et d'éviter ainsi leur coagulation et par suite l'emprisonnement des graisses par la dessication, nous avons toujours désormais utilisé ce dissolvant.

Une objection se présentait cependant à notre esprit . La cholestérine et surtout ses éthers sont insolubles dans l'alcool à froid; il était donc indispensable de traiter la substance par l'alcool bouillant: or, dans le Soxhlet, l'al-

cool condensé dans le réfrigerant retombe sensiblement froid sur le produit à épuiser, l'extraction ne peut donc être complète. C'est pourquoi nous avons jugé nécessaire de terminer le traitement par un épuisement à l'éther.

Cette action combinée des deux dissolvants avait déjà souvent utilisée pour le dosage des graisses contenues dans les organes (Hoppe Seyler (1)

Nous avions entre temps, essayé de substituer l'acétone à l'alcool dans la méthode précédente, mais nous n'avions pas obtenu de résultats plus avantageux.

Après les épuisements à l'alcool et à l'éther, les résidus ne cédaient sensiblement plus rien aux dissolvants; nous pouvions donc admettre que nous avions enlevé la totalité des graisses et des lipoïdes. C'est ce que nous avons fait jusqu'au moment où nous avons eu connaissance des importants travaux de Kümagawa et Suto (2). Ces auteurs étonnés des résultats très variables, qu'ils obtenaient avec les divers moyens d'extraction, avaient eu l'idée de traiter les résidus par une solution alcaline concentrée au bain-marie bouillant, ils avaient pu ainsi retrouver dans toutes les prises d'essai, même dans celles qui paraissaient le mieux épuisées, de petites quantités d'acides gras.

Nous avons aussitôt appliqué leur procédé de contrôle à nos précipités d'albuminoïdes, que nous avions cru extraits à fond, et nous avons pu, nous aussi, retrouver un peu d'acides gras échappés au traitement (jusqu'à 10 %)

1. Hoppe Seyler. Handbuch -- 7e éd. 489.
2. Kumagawa-Suto (loc cit)

Notre méthode à l'alcool et à l'éther était donc insuffisante. Nous n'avons plus alors employé que l'alcool, mais pour l'épuisement nous nous sommes toujours servi de l'extracteur à chaud de Kümagawa et Suto. Comme vérification nous avons traité des résidus par un autre dissolvant, ou même par la saponification directe: jamais nous n'avons retrouvé de quantités appréciables de matières grasses. Nos résultats ont donc concordé pleinement avec ceux de Kümagawa.

Nous avions donc enfin un extrait éthéré complet: il nous restait à voir, s'il était suffisamment pur.

Dès nos premiers essais, notre attention avait été mise en éveil par une expérience faite sur le sang d'un azotémique Le sérum de ce malade renfermait 3 gr.50 d'urée par litre. 112 cc3, déssèchés dans le vide et finalement pulvérisés furent traités par la méthode de Soxhlet. Au bout de six heures d'extraction, on pouvait voir sur les parois du ballon, qui contenait l'éther, des cristaux très blancs réunis parfois en petites boules. Nous avons alors changer de récipient et continué l'épuisement avec de nouvelles quantités d'éther pendant quatre jours Les mêmes cristaux se déposèrent jusqu'à la fin. Les liqueurs éthérées furent réunies et les cristaux séparés par filtration furent lavés à l'éther, puis dissous dans l'alcool. Par évaporation on obtint un produit bien cristallisé, fondant vers 134°, très solubles dans l'eau et décomposables par l'hypobronite de soude avec dégagement d'azote. Nous étions donc en présence d'urée, qui théoriquement est sensiblement insoluble dans l'éther

Par suite des lèxiviations prolongées, celui-ci en avait enlevé une quantité qui correspondait à 1gr.98 par litre de sérum.

C'est pourquoi lorsqu'on reprend l'extrait alcoolique bien déssèché par l'éther anhydre, il passe toujours en solution une certaine quantité de matières azotées.

Nous avions pensé à en donner une autre preuve que nous avons d'ailleurs retrouvée plus tard dans le travail de Kümagawa (1) si l'extrait étheré ne renfermait que des graisses et des lipoïdes bien purs, il ne devrait donner en azote que ce qui revient à la lécithine. Par conséquent en dosant celle-ci par le phosphore contenu dans l'extrait, on pourrait calculer la quantité théorique d'azote fournie par la choline. L'expérience nous a montré dans deux ou trois dosages, que l'on en trouve une proportion tellement élevée, que même si l'extrait éthéré ne renfermait que de la lécithine, ce ne serait encore pas suffisant pour expliquer l'origine de l'azote. Kümagawa et suto ont étudié avec plus de détails ces impuretés azotées dans l'extrait étheré de la poudre de viande. Ils ont séparé différentes fractions d'azote, et caractérisé très nettement la créatine.

Enfin en étudiant le sérum de divers malades, des ictériques en particulier, nous avons remarqué qu'il passait dans la reprise à l'éther une quantités d'impuretés bien plus notable encore que chez les azotémiques.

En présence de cette composition de nos extraits éthérés, nous ne pouvions penser à doser même approximativement, les graisses par différence après déduction de la lécithine et de la cholestérine. Une analyse spéciale leur était nécessaire et l'ex-

1 Kumagawa - Suto (loc cit)

traction des acides gras par saponification employée déjà pour les poudres d'organes par Liebermann, Szkeley (1) puis par Kümagawa et Suto (2), pouvait seule convenir. Toutefois au lieu de traiter directement la substance à analyser, nous devions ici n'opérer que sur son extrait étheré pour éviter les causes d'erreur dues à la présence des phosphates minéraux.

Ce procédé venait d'être proposé par Shididzu (3) dans l'analyse du sang et de quelques organes, mais pour des raisons tout à fait différentes de la nôtre.

Nous avions donc une méthode de dosage des acides gras et des substances insaponifiables: il était nécessaire de la compléter par un procédé de séparation de la cholestérine, puis par un dosage du phosphore passé dans la solution aqueuse.

Une fois la saponification terminée, nous pouvons, comme Grigaut (4) agiter le liquide encore tiède avec de l'éther, qui enlevait les substances insaponifiables. Nous avons préfèré libèrer d'abord les acides gras, les extraire en même temps que la cholestérine et enfin purifier le tout plusieurs fois. Après avoir pesé l'extrait ainsi obtenu nous avons utilisé pour la séparation de la cholestérine le procédé de Kümagawa et Sudo (5) et plus tard la formation d'un complexe avec la digitonine (Windaus (6), Mayer et Schaeffer (7)).

Par suite de la saponification des lipoïdes, le phosphore libéré était passé sous forme de glycérophosphate et de phosphate alcalins dans la solution aqueuse. Il ne nous restait plus qu'à évaporer le liquide, minéraliser le résidu et doser le phosphore par celle des méthode générales qui convenait le mieux ici.

1 Liebermann - Szekely (loc cit)
2 Kumagawa Suto (loc cit)
3 Schimidzu (id)
4 Grigaut - Loc biol. 20 juil 1911.
5 Kumaga Suto (loc cit)
6 Windaus id
7 Mayer Schaeffer. id

Après de nombreux essais nous avons adopté la précipitation à l'état de phosphomolybdate et la pesée directe du précipité après lavages et dessication à 100°. Avec le poids du phosphore il était facile de calculer la lécithine et ensuite les acides gras qu'elle avait fournis à la saponification.

D'autre part comme Hürtle (1) et Hepner (2) avaient trouvé uniquement des éthers de la cholestérine dans le sang nous pouvions admettre que toute notre cholestérine dosée se trouvait combinée; aussi, pour déterminer les graisses proprement dites, il fallait soustraire du poids de l'extrait éthéré obtenu après saponification les acides gras de la lécithine puis la cholestérine éthérifiée.

C'est d'après cette méthode que nous avons publié nos premiers dosages chez les normaux et chez les brightiques (3) - Quand, plus tard, nous avons commencé l'étude du sang des ictériques nous avons observé (4), dès le début, en suivant la technique de Hürtle, la présence de cholestérine libre en quantité très notable. Il devenait donc nécessaire de doser séparement la cholestérine libre et la cholestérine étherifiée pour pouvoir évaluer avec précision les graines neutres et les acides gras libres C'est en nous basant sur les recherches de Windaus (5) que nous avons pu résoudre cette dernière difficulté et obtenir enfin l'analyse complète et exacte des graisses et des lipoïdes extraits du sérum sanguin.

1 Hürtle (loc cit)
2 Hepner (loc cit)
3 F. Widal - André Weill et M. Laudat (loc cit).
4 id - id id
5 F. Widal - André Weill et M. Laudat Soc. Biol 1913 26 avril.
et L. Grimbert - M. Laudat et André Weill id id id.

Pour ne pas donner trop d'extension à cet exposé de nos recherches, nous avons du laisser de côté bon nombre d'expériences qui ont contribué plus ou moins directement à la mise au point de nos procédés. C'est ainsi que pour le dosage des graisses et de la cholestérine totale nous avons à plusieurs reprises analysé parallèlement les mêmes sérums par les méthodes de Grigaut (1) Kumagawa Suto (2) et Schimidzu (3).

Cela nous a mieux permis d'apprécier la valeur des modifications particulières à chaque auteur et la mise au point de notre analyse générale en a beaucoup profité.

D'autre part, on pouvait penser qu'en principe toutes les méthodes de dosage du phosphore pouvaient indifféremment être employées. Nos expériences comparatives nous ont fait préfèrer l'emploi de molybdate { } et nous ont amené à préciser des détails qui, dans notre cas, présentaient une grosse importance. C'est ainsi par exemple, que pour de très petites quantités de phosphore à doser nous avons vu la nécessité de proportionner le réactif molybdique au volume total du liquide et non à la quantité de phosphore, comme cela est généralement conseillé Dans plusieurs séries d'expériences, nous n'avons obtenu que des précipitations partielles, ou même des résultats complètement négatifs.

Enfin pour vérifier si le grand nombre d'opérations sur la même prise d'essai et pour des quantités de lipoïdes aussi faibles, n'entrainait pas des pertes notables, nous avons

1 Grigaut (loc cit)
2 Kumagawa-Suto (loc cit)
3 Schimidzu (loc cit)

fait sur les mêmes sérums des analyses complètes et des dosages partiels de cholestérine totale et de lipoïdes phosphorés. En opérant avec les précautions habituelles, les différences constatées n'ont pas dépassé 3 à 5 %.

Avant de passer à l'exposé détaillé de notre analyse générale nous voulons dire qualques mots du dosage des savons .

Dans notre premier chapitre (1), nous avons vu que leur existence dans le sang, après avoir été assez discutée, avait été définitivement établie par Hoppe-Seyler; il (2) avait même donné, en 1884, une technique spéciale pour les extraire et les doser.

Depuis nous les avons vu souvent mentionnés dans les méthodes d'analyse. Dans la saponification directe, ils sont décomposés par l'addition d'acides gras. Lorsqu'on enlève directement les matières grasses par un dissolvant, ils peuvent être eux aussi, entrainés; mais ils sont éliminés peu après au cours des purifications par l'éther ou l'éther de pétrole, dans lesquels on a démontré leur insolubilité complète. C'est ce qui se passe dans notre tecnique générale.

Nous avons cependant voulu, dans quelques examens, nous rendre compte de leurs proportions. Après avoir épuisé par l'éther, l'extrait alcoolique déssèché et pulvérisé, jusqu'à ce que l'on n'obtienne plus de résidu par évaporation du dissolvant, nous avons repris la partie insoluble avec un peu d'eau tiède. La solution trouble a été filtrée et l'addition de quelques gouttes

1 page . 12
2 Hoppe Seyler Zeit f Physiol Chemi 8 . 1884 . p 503 - 507 .

d'acide y a déterminé l'apparition d'un nouveau trouble, quelquefois même d'un précipité. Le mélange, agité avec de l'éther, est redevenu limpide et la solution éthérée lavée et sèchée a laissé par évaporation un résidu d'acide gras. La quantité obtenue nous a paru en général assez faible (0 gr 30 à 0 g.50 chez les individus normaux).

Comme ce dosage ne paraissait pas présenter pour le moment une réelle importance, nous l'avons habituellement négligé dans nos analyses.

2° Exposé détaillé de notre méthode de dosage des Graisses et des Lipoïdes dans le sérum sanguin. (1)

L'expérience nous a montré que la quantité de sérum à employer pour faire un dosage dans des conditions favorables, est de 20 cc3. Dans certains cas pathologiques, où l'on pense trouver une proportion de graisses notablement supérieure à la normale, on peut se contenter de 15 ou même de 10 cc3. Ce sont là des exceptions.

20 cc3 sont nécessaires, car, dans les cas habituels ils permettent d'obtenir des pesées minimum de 0 g.02 à 0 g.03, au-dessous de ces chiffres, les causes d'erreurs seraient trop grandes. Ils doivent aussi être suffisants, car il serait difficile d'obtenir une prise d'essai habituelle plus forte. Si, en

(1) L. Grimbert et M. Laudat. C.R. Ac. Sc. t 155, p. 974. nov 1912.
L. Grimbert, M. Laudat et André Weill. C.R. Soc. Biol. t LXXIV p. 898. avril 1913.

effet, on désire faire des dosages en série chez des brightiques, ou encore étudier des sujets normaux ou anémiés; on comprend qu'on ne puisse demander à prélever plus de 50 cc3 de sang qui fournissent à peu près 21 à 23 cc3 de sérum.

Nous avons préféré faire nos examens sur le sérum plutôt que sur le sang total parce que on l'obtient beaucoup plus simplement et parce que les dosages sont plus comparables entre eux.

Nous avons choisi l'alcool à 95°, car des recherches comparatives avec l'alcool absolu nous ont donné les mêmes résultats.

Le temps de contact à froid n'offre pas d'importance. La durée de l'extraction varie un peu selon la quantité et la nature du sérum à traiter. En général, elle est complète au bout de quatre heures, en la prolongeant de deux heures on pourra satisfaire à tous les cas.

Le chauffage du ballon qui renferme l'alcool se fera très aisément au bain de sable ou sur une toile d'amiante. Il sera utile pour assurer une ébullition régulière de mettre dans l'alcool quelques morceaux de fil de platine ou de petits débris de verre.

Les matières albuminoïdes précipitées par l'alcool seront recueillies sur une douille de Schlicher et Schül, qui servira de filtre. Il sera utile de la laver d'abord à l'alcool bouillant. La nacelle de l'appareil de Kümagawa jouera le rôle d'entonnoir.

Les solutions alcooliques seront réunies et l'alcool sera distillé. On s'arrêtera quand il ne restera plus dans le ballon que 30 cc3 environ. Ce liquide sera transmis encore chaud, dans une capsule plate de porcelaine: on y joindra l'alcool de lavage et le tout sera évaporé au bain-marie. On achèvera la dessication de l'extrait obtenu par un séjour de quelques heures à l'étuve à 50°. (Comme Kümagawa, nous avons adopté cette température, à laquelle les acides gras ne risquent pas de s'oxyder)

Au sortir de l'étuve, le produit sera traité par l'éther anhydre (obtenu par distillation sur le sodium) Ce traitement sera répèté jusqu'à ce que le liquide d'épuisement ne laisse plus de résidu. Les solutions éthérées réunies seront centrifugées dans des tubes à bec de 40cc environ.(Nous avons finalement adopté la centrifugation. En effet lorsquel'on filtre sur papier ou sur coton dégraissé, on n'obtient que des résultats peu satisfaisants Nous nous sommes longtemps servi du filtre d'amiante de Kümagawa Pour obtenir un filtrat limpide, l'amiante doit être bien tassée; dans ce cas la filtration est assez lente. Il se produit rapidement une sorte de colmatage du filtre, qui donne des produits mieux purifiés, mais peut retenir ainsi des graisses, que les lavages successifs à l'éther parviendront mal à ~~les~~ enlever. Ce sont ces divers inconvénients qui nous ont fait préférer la centrifugation Avec elle, ils sont complètement supprimés, et les produits obtenus sont très purs.

Lorsque l'éther sera limpide, on le décantera dans une capsule tarée. Les tubes et les vases seront rincés avec une petite quantité d'éther qui servira à épuiser les dépots produits par la centrifugation.

Les liqueurs éthèrées seront évaporées à basse température. On évitera les dangers d'inflammation en utilisant le dispositif décrit par Kumamagawa et Suto (1).

L'extrait éthéré obtenu sera sèché à 50° et pesé. La connaissance de son poids donnera une idée approximative de la teneur en graisses et indiquera plus tard la quantité d'alcali nécessaire pour la saponification. Il contient à l'état brute la totalité des graisses neutres, des acides gras preexistants, des lipoïdes phosphorés et de cholestérine libre et combinée.

La première opération consiste maintenant à séparer et à doser la cholestérine libre d'après la méthode de Windaus (2) Comme nous l'avons vu, elle repose sur la formation d'un complexe entre la cholestérine et la digitonine. Cette combinaison se produit dans le rapport de 1 à 3. La quantité de digitonine nécessaire est donc théoriquement trois fois celle de la cholestérine Comme nous ne pouvons connaitre celle-ci avant de l'avoir dosée, nous mettons un poids de digitonine égal à la moitié de celui de l'extrait éthèré. Cette quantité constitue en général un grand excès: nous nous sommes assurés qu'il n'était nuisible - Chez les ictériques, il est quelquefois nécessaire d'augmenter cette proportion.

La digitonine ne se dissout pas dans l'alcool à froid, et il faut porter le mélange à l'ébullition. Elle ne se dépose pas par le refroidissement. Elle est complètement insoluble dans l'éther, qui la précipite de sa solution alcoolique; c'est pourquoi l'extrait éthéré ne devra pas être dissous dans l'éther mais dans l'alcool à chaud.

1 Kumagawa - Suto (loc cit)
2 Windaus (id)

Le complexe se forme à l'ébullition en milieu alcoolique et il se sépare par refroidissement. On emploie la digitonine en solution à 1 %. L'extrait étheré est dissous dans 30 à 40 fois son poids d'alcool. Ces proportions doivent être exactement observées. Nous avons vu que dans le cas d'une dilution plus considérable, la précipitation était partielle ou nulle.

Le titre de l'alcool a employer varie avec les auteurs. Windaus (1) fait la solution de digitonine dans l'alcool à 95° et celle de l'extrait dans l'alcool à 90° Fraser et Gardner (2) emploient uniquement l'alcool à 95°.

Nous avons parfois observé qu'en suivant exactement la technique de Windaus la précipitation ne se produisait pas complètement. Nous pensons qu'elle dépend un peu du rapport qui existe dans l'extrait éthéré entre la cholestérine libre et le reste des lipoïdes et des graisses. La séparation du complexe se produisant par la présence d'une petite quantité d'eau, nous avons essayé, sur le conseil de Mayer et Schaeffer, de déterminer une modification physique plus brusque en ajoutant l'eau quand le complexe est déjà formé et quand la solution alcoolique est encore à l'ébullition. Nous avons obtenu avec cette modification des résultats très satisfaisants. En opèrant ainsi, il est nécessaire de faire les deux solutions dans l'alcool absolu, pour que l'addition d'eau ne fasse pas tomber le titre alcoolique au-dessous de 95° ou de 90° au plus.

1 Windaus (loc. cit)
2 Fraser et Gardner (id)

Après une heure de repos, on sépare le précipité par centrifugation dans un gros tube taré; on le lave soigneusement à l'alcool pour éliminer la digitonine en excès, puis à l'éther pour le débarrasser de toute trace de graisses et de lipoïdes. En opérant ainsi, il est plus facile de mettre le complexe en suspension dans les dissolvants et la purification est plus complète.

On réunit toutes les solutions alcooliques. Elles contiennent en plus des matières grasses, la digitonine en excès. Il faut l'éliminer sinon, pendant la saponification, elle risquera de fixer la cholestérine libérée. La formation de ce nouveau complexe ne présenterait dans ce cas aucun intérêt, en raison des conditions dans lesquelles elle se serait produite.

D'autre part son élimination nous prouve qu'il y en avait bien un excès.

Windaus[1] évapore une partie de l'alcool, ajoute de l'eau au résidu, puis agite le tout avec de l'éther, la digitonine passe en solution hydro-alcoolique, les graisses et les lipoïdes en solution éthérée. Par suite de la présence d'alcool, la séparation bien nette, en apparence, n'est cependant pas assez satisfaisante. La couche éthérée retient toujours un peu d'eau et d'alcool, la couche hydro-alcoolique un peu d'éther. Il en résulte une petite perte de matières grasses et la digitonine n'est pas complètement éliminée.

La technique de Fraser et Gardner[2] ne donne pas de meilleurs résultats; nous avons en effet remarqué que la dessication fait

(1) Windaus (loc cit)
(2) Fraser et Gardner. (15)

perdre des lipoïdes phosphorés.

Nous avons pris soin à concentrer la solution alcoolique à un très faible volume, 20 cc^3 au plus, puis avant qu'elle ne soit refroidie et que les graisses ne précipitent, on la verse dans un grand excès d'éther, 100 à 150 cc^3, auquel on ajoute les solutions éthérées qui ont servi à laver le complexe. La digitonine, insoluble, se précipite, les graisses et les lipoïdes restent en solution. Après une heure de repos, le liquide est décanté et centrifugé; les précipités sont réunis et lavés plusieurs fois à l'éther. On distille les solutions éthérées; leur résidu doit correspondre à l'extrait éthéré, diminué de la cholestérine libre.

Ce procédé très simple ne modifie nullement les graisses et les autres lipoïdes.

Nous pouvons maintenant opérer la saponification. Elle a lieu au bain-marie bouillant, en milieu alcoolique, et ne nécessite qu'une quantité relativement faible d'alcali. Les graisses se dissolvent à chaud dans l'alcool même un peu dilué, et leur décomposition est ainsi plus rapide. Nous employons la potasse en solution dans l'alcool à 70°, au titre N/2,5 à raison de 25 cc^3 pour 0 gr.20 d'extrait éthéré. Schimidzu [1] conseille une quantité bien plus importante d'alcali: nos expériences nous ont montré que la proportion indiquée plus haut était non seulement suffisante, mais que l'excès neutralisé par l'acide azotique permettait la minéralisation complète du glycérophosphate et des matières organiques passées en solution aqueuse. Par précaution, on peut ajouter un peu de carbonate de soude pendant l'évaporation du liquide.

(1) Schmidzu (loc cit)

L'emploi d'un très léger excès d'alcali présente l'avantage d'augmenter la précision du dosage du phosphore. Villiers et Borg[1] ont, en effet, observé que la présence d'une certaine quantité de sels neutres diminuait un peu l'exactitude de la précipitation.

Enfin, en opérant au bain-marie bouillant et en condensant l'alcool à l'aide d'un réfrigérant, trois heures suffisent pour assurer la saponification complète des graisses et des lipoïdes.

On distille ensuite presque la totalité de l'alcool; la solution aqueuse des savons, encore chaude, est traitée par un peu d'acide azotique dilué qui libère les acides gras. Nous avons choisi l'acide azotique parce que la précipitation du phosphomolybdate doit précisément se faire en milieu azotique. On réserve la couche aqueuse pour le dosage du phosphore.

Les liqueurs éthérées sont lavées avec de l'eau distillée pour enlever toute trace d'acidité, séchées et évaporées. Il est très important d'avoir une solution éthérée bien neutre. Nous avons remarqué que si on acidule sans précaution et si on ne lave pas l'éther, celui-ci renferme un peu d'eau acidulée en solution. Quand l'évaporation sera presque terminée, les graisses se trouveront à chaud en présence d'une solution relativement concentrée en acide nitrique; elles s'oxyderont et donneront des produits insolubles dans l'éther anhydre et dans l'éther pétrole.

Le résidu, laissé pendant une heure ou deux dans l'étuve

1 - Villiers et Borg - (loc cit).

à 50° est purifié par l'éther anhydre, puis par l'éther pétrole. Après chaque opération les solutions sont séparées par centrifugation et leurs extraits sont séchés à 50°. On élimine ainsi presque complètement les impuretés et les pigments.

Nous avons fait des distillations fractionnées d'éther de pétrole du commerce; l'essai des diverses fractions obtenues nous a montré que les meilleurs résultats étaient fournis par ce qui distille entre 40 et 60°. On peut se contenter, en pratique, de l'éther de pétrole rectifié commercial, qui passe entre 35 et 70°. Il faut surtout éviter la présence de carbures à points d'ébullition élevée.

Enfin, dans cette reprise par l'éther de pétrole, il faut en remuant doucement déterminer la solution de l'extrait, puis abandonner au repos pendant une à deux heures. Les impuretés se séparent complètement, donnent un dépôt résineux adhérent au fond du vase. (1)

Les solutions évaporées laissent un résidu d'acide gras et de cholestérine. On le riche à 50° et on le pèse.

Pour en séparer la cholestérine libérée, on opère exactement comme pour la cholestérine libre. On peut également éliminer la digitonine en excès et isoler les acides gras bien purs. Généralement on se contente de les évaluer par différence.

---

(1) Peut-être se produit-il ici une légère perte d'acides gras et de cholestérine par entraînement? elle ne doit pas, en tous cas, être bien importante.

Il ne nous reste plus qu'à donner quelques détails pratiques sur le dosage des lipoïdes phosphorés. Comme la solution aqueuse provenant de la saponification est parfois assez abondante et comme aussi, il est préférable de l'évaporer dans le vase qui doit servir à la calcination, nous employons toujours un large creuset de Saxe. Le liquide est évaporé au bain-marie bouillant et le résidu séché à l'étuve à 100°. La calcination se fait très bien à la flamme d'un bec Bunsen: on doit seulement chauffer un peu doucement au début. La minéralisation s'opère très tranquillement, sans projection et en quelques minutes. On laisse refroidir et on reprend la masse fondue avec un peu d'eau acidulée par l'acide azotique. On porte à l'ébullition pour assurer la dissolution complète des sels et pour chasser les produits nitreux qui auraient pu se former. Après refroidissement la solution est filtrée et reçue dans un gros tube à centrifuger, taré, à fond plat. On lui ajoute, à l'aide d'un tube effilé pour éviter le mélange immédiat, du réactif de Sonnenschein, dix à vingt cc^3 selon la quantité présumée de phosphore et selon surtout le volume total du mélange. Après une heure de repos, on agite plusieurs fois le tube et son contenu. On le laisse ensuite pendant cinq heures à l'étuve à 40°. Le phosphomolybdate précipité est séparé par centrifugation; on le lave avec de l'eau renfermant 1/20 de réactif molybdique, puis avec un peu d'eau pure. On le sèche et on le pèse. En accomplissant toutes les opérations dans le tube taré, on évite de nombreuses causes d'erreur.

Nous avons terminé l'exposé de notre analyse générale ou

plus exactement, l'explication détaillée de toutes les opérations qu'elle comprend, même des plus simples. Avant de passer aux applications que nous lui avons données en physiologie et en pathologie, nous croyons utile de réunir dans un tableau schématique la liste et la composition des principaux réactifs employés, la marche analytique proprement dite et les coefficients utilisés dans les calculs.

1°- Les principaux Réactifs employés dans nos dosages.

Alcool absolu - alcool à 95°

Ether anhydre, distillé sur le sodium, éther à 65°

Digitonine Merck en solution à 1 % dans l'alcool absolu

Potasse alcoolique N/2,5 dans l'alcool à 70°

Ether de pétrole rectifié 35° - 70°

Réactif de Sonnenschein: dissoudre 150 gr. de molybdate d'ammoniaque dans de l'eau tiède, compléter 1 litre avec de l'eau froide et verser cette liqueur dans un litre d'acide azotique de densité 1,20.

2°- Marche analytique

Prise d'essai: 20 cc

I - EXTRACTION - 20 cc^3 sérum + 100 cc^3 alcool à 95°

Filtrer - Extraire à chaud avec 50 à 80 cc^3 alcool à 95°

(appareil de Kumageuva et Suto)

Distiller les solutions alcooliques: s'arrêter vers 30 cc^3 - Transvaser le liquide. Evaporer et sécher à 50°

Epuiser le résidu à l'éther anhydre. Centrifuger. Décanter. Evaporer. Sécher. Peser.

Extrait éthéré = P.

II - <u>Dosage de la Cholestérine libre</u>.

Dissoudre P dans 50 P d'alcool absolu. Mêler avec solution de digitonine à 1 % q.s. pour avoir 1/2 P de digitonine. Faire bouillir. Ajouter de l'eau q.s. pour avoir un mélange alcoolique à 95°. Précipité. Repos. Centrifuger. Laver à l'alcool et à l'éther. Dessècher à 100; peser.

Complexe = C'.

III - <u>Saponification</u>.- Concentrer à 20 cc^3 les solutions alcooliques: mêler à 150 cc^3 d'éther. Précipité. Centrifuger. Laver. Distiller les solutions éthérées. Résidu + potasse alcoolique N/2,5 : $(\frac{P}{0,20} \times 25)$.

Saponifier 3 heures au B.M. Distiller - Aciduler. Enlever les acides gras et l'insaponifiable par l'éther. Laver l'éther, lè sécher - Evaporer et sécher l'extrait à 50° - Reprendre (éther anhydre, puis éther de pétrole) Centrifuger. Sécher. Peser.

Acides gras + Cholestérine libérée = A. G.

IV - <u>Dosage de la cholestérine libérée</u> (Comme en II)

V - <u>Dosage des lipoïdes phosphorés</u>.- Evaporer la solution aqueuse Dessécher. Minéraliser. Dissoudre dans l'eau acidulée. Faire bouillir, filtrer, précipiter (réactif de Sonnenschein: q.s. selon conditions). Centrifuger, laver, sécher, peser.

Phosphomolybdate = P.T.

3°. Calculs.

Cholesterine libre : $C^1 \times 0{,}2431$.

Cholestérine libérée : $C^2 \times 0{,}2431$.

Acides Gras totaux : $A.G - (C^2 \times 0{,}2431)$

Lipoides Phosphorés : $\frac{P.T}{2{,}3}$
(calculés en lécithine)

Acides Gras de la Lécithine : $\left(\frac{P.T}{2{,}3}\right) 0{,}689$.

Acides Gras des Ethers de la Cholestérine : $(C^2 \times 0{,}2431)\, 0{,}73$

Acides Gras des Graisses Neutres et Acides Gras préexistants =

$$A.G. - \left((C^2 \times 0{,}2431)\, 0{,}73 + \left(\frac{P.T}{2{,}3}\right) 0{,}689 + C^2 \times 0{,}2431 \right)$$

7me CHAPITRE.

-o-

Les GRAISSES et les LIPOIDES dans le sang aux points de vue PHYSIOLOGIQUE et PATHOLOGIQUE.

-o-

1° - ÉTAT ACTUEL de nos CONNAISSANCES. -

Nous avons vu au début de notre premier chapitre que les graisses avaient été signalées dans le sang à la fin du 18me siècle. Depuis on s'est efforcé de préciser leur nature et on a cherché à les doser, de préférence dans les cas pathologiques où elles paraissaient particulièrement abondantes.

Les méthodes employées furent malheureusement peu rigoureuses et surtout peu comparables; d'autre part ces analyses ne portèrent que sur des cas isolés, en général très différents. Le diabète seul a attiré assez fréquemment l'attention.

Le premier et le seul travail d'ensemble est dû à BECQUEREL et RHODIER[1] qui analysèrent le sang chez l'individu normal et chez des malades atteints d'affections très variées. L'insuffisance de leur méthode analytique enlève une grande partie de l'intérêt qui aurait pu s'attacher à leur mémoire.

Plus tard, HOPPE-SEYLER,[2] THOERFELDER,[3] ABDERHALDEN,[4] etc.... ont étudié avec des techniques meilleures la composition du sang total, des globules et du sérum dans la série animale.

1 Becquerel et Rhodier (loc. cit.)
2 Hoppe Seyler (id.)
3 Thierfelder (loc. cit.)
4 Abderhalden (loc. cit.)

Enfin on a assez fréquemment étudié l'influence de la digestion et surtout de divers agents d'intoxication sur les variations de graisses du sang. Mentionnons en dernier lieu de rares analyses dans des cas de nephrites, de leucémie et de goutte.

Durant ces dernières années seulement on a envisagé l'étude méthodique des lipoïdes dans diverses affections: la cholestérine dans la tuberculose (Gérard)[1], dans les maladies du rein, du foie, dans le typhus, les infections, la grossesse (Chauffard, Laroche et Grigaut)[2] (Neumann et Hermann)[3] dans la syphilis (Gaucher, Paris et Desmoulières)[4] dans le diabète (Apert, Pechery et Rouillard)[5], la lécithine dans la syphilis, le cancer (Takemura)[6], la paralysie, le tabès (G. Peritz)[7] enfin dansde nombreux états pathologiques (Kimura et Steep).[8]

Toutes ces recherches sont très intéressantes puisqu'elles apportent la connaissance de données nouvelles à la physiologie et à la pathologie. Elles se prétent cependant à quelques critiques d'ordre général. Tout d'abord elles sont souvent faites d'après des méthodes différentes et les résultats sont peu d'accord (Gérard et Grigaut par exemple) D'autre part l'étude particulière d'une lipoïde peut conduire à des interprétations inexactes. En effet, les graisses et les lipoïdes ont trop d'affinités, trop de rapports entre eux pour que les études isolées puissent une fois groupées donner des résultats complets et sûrs.

1 Gerard. Soc. Med. Hop. Paris 27 juin 1912.
2 Chauffard Laroche Grigaut (Soc Biol. 1911 loc cit)
3 Neumann et Herman. Wien Klin. Wochenschr. mai 1911
4 Gaucher, Paris et Desmoulières Bulletin acad. Medecine. 16 juillet 1919.
5 Apert Pechery. Rouillard Soc. Biol. 29 mai 1912
6 Takemura Zeitschr. Zeitschr 1910. 9. 1908.
7 Peritz Zeit. f exp. Pathol u Therap. 5 – 607.621.
8 Kimura et Steep Deut. Archiv f Klin. Med. 104, 1911 nov 1911

Il nous a paru indispensable de pouvoir suivre leurs variations en même temps, sur la même prise de sang, chez le même malade.

C'est ce qui nous a amené à élaborer une méthode d'analyse complète applicable facilement en pathologie. Nous croyons qu'avec elle, si les recherches sont beaucoup plus longues et plus minutieuses, on obtiendra toutefois des résultats plus solides et plus généraux.

2° - RÉSULTATS ACQUIS par nos RECHERCHES. -

Les études que nous avons entreprises aux points de vue physiologique et pathologique ont été faites sous la direction et dans le service de M. le Professeur F. WIDAL avec la collaboration de M. le Dr André WEILL. (1)

Notre premier sujet de recherches a été la détermination quantitative des graisses et des lipoïdes dans le sérum des brightiques. Nous avons vérifié les limites de leurs variations et l'influence de l'apport alimentaire. Enfin nous avons précisé les rapports qui existent entre les éléments constituants de la "matière grasse" des anciens auteurs. Comme mesure de comparaison nous avons fait au préalable la même étude chez quelques sujets normaux.

Les cholestérines libre et éthérifiée ont au point de vue biologique des propriétés absolument différentes. Nous avons essayé de déterminer à quel état se trouvait ce lipoïde dans le sérum des brightiques d'abord, puis des ictériques et des normaux.

En suivant la technique très approximative de Hürtle

(1) F. Widal, André Weill et M. Laudat - Semaine médicale (loc. cit.) Soc. Biol.

nous n'avons retrouvé chez les brightiques et les normaux que des éthers, de l'oléate principalement. Par contre, chez les malades atteints d'affection du foie nous avons isolé des quantités notables de cholesterine libre.

Plus tard, en possession d'une technique bien précise pour la séparation de la cholesterine libre en présence de ses éthers, nous avons en partie confirmé nos premiers résultats. Chez les normaux et chez les brightiques, il existe un peu de cholesterine libre 1/4 à 1/5 environ de la quantité totale; le reste est combiné aux acides oléïque et palmitique.

Chez les ictériques, la cholesterine libre peut atteindre de très fortes proportions. Dans deux cas elle a atteint les 7/8 du chiffre global.

Enfin, nous terminons en ce moment une série de recherches sur le passage des graisses et des lipoïdes dans le sang au cours des diverses formes d'ictère.

CONCLUSIONS

Avant d'aborder les conclusions de ce travail, nous voulons d'abord rendre hommage aux deux savants KUMAGAWA et SUTO, qui, par leur étude, si précise et si documentée, ont facilité notablement les recherches sur cette question du dosage des graisses, qui, avant eux, restait si obscure. C'est enfin à WINDAUS que nous devons d'avoir pu déterminer la valeur sensiblement exacte des graisses et de chaque lipoïde en particulier.

Au point de vue chimique:

Nous avons pu obtenir la totalité des graisses et des lipoïdes contenus dans le sérum par une simple extraction à l'alcool, en nous basant sur nos recherches complétées par celles de KUMAGAWA et SUTO.

Nous avons donné une technique détaillée pour la saponification de l'extrait éthéré et la séparation de la cholesterine des acides gras.

Nous avons été amenés à préciser la méthode de dosage du phosphore des lipoïdes phosphorés en raison des conditions dans lesquelles nous nous étions placés.

Nous avons adapté la méthode de WINDAUS à notre technique générale pour séparer la cholesterine libre de ses éthers. Nous avons donné un mode d'élimination simpbe et précis de la digitonine en excès.

-o-

AU POINT de VUE PHYSIOLOGIQUE et PATHOLOGIQUE.

Nous avons déterminé la quantité respective des graisses et des lipoïdes chez l'individu normal.

Nous avons étudié en détails l'influence de l'alimentation sur les variations de ces divers éléments.

Nous avons montré que chez les brightiques il n'existe pas seulement une cholestérinemie, mais bien plutôt une lipémie.

Chez les ictériques au contraire nous avons mis en évidence le rôle prépondérant de la lipoïdémie.

Chez les malades atteints de Xanthome nous avons trouvé l'existence constante d'une lipémie dans les cas que nous avons pu examiner.

Nous avons apporté une distinction importante entre la cholestérinemie des brightiques et celle des ictériques en déterminant respectivement les cholesterines libre et éthérifiée.

Nous avons pu présumer que la lécithine ne varie pas régulièrement comme les graisses et la cholesterine et nous espérons pouvoir, par des dosages ultérieurs, et l'étude d'autres affections, établir plus nettement ses variations propres.

Enfin, en employant notre méthode on pourra maintenant faire régulièrement en série chez des malades, l'examen complet des graisses et des lipoïdes du sang, ce qui n'avait pu être réalisé jusqu'ici, soit par le

manque d'une méthode générale, soit encore parce que les quantités de sang nécessaires interdisaient des recherches en pathologie.

